Aus dem Institut für Blutgerinnungswesen
und Transfusionsmedizin
der Medizinischen Einrichtungen der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. H. Brüster

SUCHE, IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON HLA-ANTIKÖRPERN UND IHRE PRAKTISCHE BEDEUTUNG IN DER TRANSFUSIONSMEDIZIN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von
Gabriele Götz
1981

UNIV.
LISCUN
MAD.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536502_0030

Aus dem Institut für Blutgerinnungswesen
und Transfusionsmedizin
der Medizinischen Einrichtungen der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. H. Brüster

SUCHE, IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON HLA-ANTIKÖRPERN UND IHRE PRAKTISCHE BEDEUTUNG IN DER TRANSFUSIONSMEDIZIN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von
Gabriele Götz
1981

"Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf"

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Arnold

Referent
gez.: Prof. Dr. Brüster

Korreferent
gez.: Prof.Dr. Beck

Meiner Familie

zum Dank

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1 Die Entdeckung des HLA-Systems 2

1.2 Der MHC des Menschen 4

1.2.1 HLA-A,B,C 5

1.2.2 HLA-D 8

1.2.3 HLA-DR 10

1.2.4 Gene für Komplement-Komponenten 11

1.2.5 Gene für erythrozytäre Merkmale 12

1.3 Der Haplotyp als Vererbungseinheit 13

1.4 Die Bedeutung des HLA-Systems 14

1.4.1 HLA und Transplantation 14

1.4.2 HLA und Transfusion 15

1.4.3 HLA und Erkrankungen 17

1.4.4 HLA in der Paternitätsserologie 18

2. HLA-Serologie 19

2.1 Quellen für HLA-Antiseren 19

2.1.1 HLA-Antiseren von schwangeren, primi-und multiparen Frauen 19

2.1.2 HLA-Antiseren von polytransfundierten Patienten 20

2.1.3 HLA-Antiseren von freiwillig immunisierten Personen 21

2.1.4 HLA-Antiseren von immunisierten Schimpansen und Kaninchen 22

2.2 Serologische Kreuzreaktionen im HLA-System 23

2.2.1 Kreuzreagierende Antigengruppen 23

2.2.2 Konzept der molekularen Grundlage der Kreuzreaktionen 25

2.2.3 Kreuzreagierende Antiseren 27

2.2.4 Funktionell monospezifische Antiseren 30

2.2.5 Bedeutung der kreuzreagierenden Antigengruppen für die Antikörperbildung 32

3. Methoden zur Bestimmung der Spezifität von HLA-Antiseren 33

3.1 Geschichtlicher Rückblick 33

3.2 Vergleich der Reaktionen eines unbekannten Antiserums mit den Antigenen typisierter Zellen (Referenz-Zellen) 35

3.2.1 Vortypisiertes Zellpanel 35

3.2.2 Im Routinebetrieb typisierte Zellen 37

3.3 Vergleich der Reaktionen eines unbekannten Antiserums mit den Reaktionen von Antiseren bekannter Spezifität (Referenz-Seren) 37

3.4 Weitere Methoden 38

4. Eigene Untersuchung 39

4.1 Material 39

4.1.1 Seren von weiblichen Blutspendern 39

4.1.2 Schwangerenseren 40

4.1.3 Testzellen 41

4.2 Methoden 41

4.2.1 Serumgewinnung 42

4.2.2 Vorbereitung der Testplatten 42

4.2.3 Beschickung der Testplatten mit Serum 43

4.2.4 Herstellung der Lymphozytensuspension 44

4.2.5 Durchführung des Lymphozytotoxizitäts-tests 45

4.2.6 Durchführung der Untersuchung 46

4.3 Statistische Auswertung 47

4.3.1 Chi²-Test, restriktive Analyse 47

4.3.2 Qualitätsprüfung von HLA-Antiseren 48

5. Ergebnisse 51

5.1 Seren weiblicher Blutspender 51

5.2 Schwangerenseren 53

6. Diskussion der Ergebnisse und Vergleich zur Literatur 62

7. Zusammenfassung 74

8. Literaturverzeichnis 76

9. Danksagung 88

10. Lebenslauf 89

1. EINLEITUNG

In der vorliegenden Arbeit werden Seren von primi-und multiparen Schwangeren sowie von weiblichen Blutspendern auf HLA-Antikörper untersucht.

Die klinische Bedeutung dieser HLA-Antikörper für die Transfusionsmedizin ergibt sich zum einen aus den bei Frauen wesentlich häufiger als bei Männern auftretenden febrilen Transfusionsreaktionen, wie 1960 von PAYNE und ROLFS (75) beschrieben, zum anderen aus der von AHRONS und KISSMEYER-NIELSEN (3,4) aufgezeigten Möglichkeit febriler Transfusionsreaktionen durch HLA-Antikörper im Spenderserum.
Darüber hinaus beobachteten REEKERS et al. (79) einen Einfluß der HLA-Antikörper auf das Ergebnis der Kreuzprobe.

Um einen Aufschluß über die zu erwartende Häufigkeit dieser Reaktionen zu bekommen, wird die Frequenz von HLA-Antikörpern bei den Blutspenderinnen des Instituts für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin der Universität Düsseldorf sowie bei primi-und multiparen Schwangeren der Universitäts-Frauenklinik ermittelt.
Außerdem werden die Spezifitäten der in den zytotoxischen Seren enthaltenen HLA-Antikörper identifiziert und die Seren durch Zuordnung zu Qualitätsklassen charakterisiert, um damit zugleich geeignete Seren für die HLA-Typisierung zu gewinnen.
Die Problematik der Identifizierung und Charakterisierung von HLA-Antiseren wird diskutiert.

1.1 Die Entdeckung des HLA-Systems

Das System der menschlichen Leukozytenantigene, HLA-System, trat in den Vordergrund des wissenschaftlichen Interesses, als man seine Bedeutung als Unverträglichkeitsfaktor bei Transplantationen erkannte.
Frühe tierexperimentelle Arbeiten von GORER 1938 (41) und MEDAWAR 1946 (62) hatten gezeigt, daß immunologische Vorgänge für die Transplantatabstoßung verantwortlich sind, und daß die vom Empfänger als fremd erkannten Antigenstrukturen nicht nur auf dem Transplantat selbst, sondern auch auf Leukozyten zu finden sind.
Bereits 1952 machten DAUSSET und NENNA (23) die erste Beobachtung menschlicher Leukozytenisoagglutinine, die sie mit dem Leukozytenagglutinationstest (=LAT) nachwiesen.
Zwei Jahre später, 1954, entdeckte DAUSSET (24), daß vor allem in Seren polytransfundierter Personen leukozytenagglutinierende Antikörper zu finden waren.
VAN ROOD et al. (81) gelang dann 1958 der Nachweis von agglutinierenden, später auch von zytotoxischen Leukozytenantikörpern im Serum schwangerer Frauen. Bei einer Multipara, der nach der letzten Entbindung Blut transfundiert werden mußte, kam es zu einer unerklärbaren febrilen Transfusionsreaktion. Serologische Untersuchungen mit dem LAT bewiesen, daß im Serum der Frau Leukozytenantikörper vorhanden waren.
Aus der Beobachtung, daß jedes antikörperhaltige Serum mit den angebotenen Leukozytensuspensionen ein anderes Reaktionsmuster zeigte, schlossen VAN ROOD et al. (81) auf die Möglichkeit einer unterschiedlichen Antigenstruktur auf den Leukozyten.

Noch im selben Jahr konnten PAYNE und ROLFS (73) ebenfalls den Nachweis von Leukozytenantikörpern in Schwangerenseren erbringen, und wie VAN ROOD et al. (81) so vermuteten auch sie eine fetomaternale Leukozyteninkompatibilität als Ursache, bedingt durch die Vererbung eines für die Mutter fremden Leukozytenantigens vom Vater. Umfangreiche Familienuntersuchungen, bei denen jeweils das mütterliche antikörperhaltige Serum mit den Leukozytensuspensionen aller Kinder und des Vaters getestet wurde, bekräftigten einerseits die Theorie, daß die Stimulation zur Antikörperbildung der Mutter von den fetalen Leukozytenantigenen ausgeht, andererseits zeigten diese Untersuchungen, daß die verantwortlichen Leukozytenantigene nicht erworben, sondern vererbt werden.
Die Entdeckung leukozytenagglutinierender Antikörper stand somit am Anfang der Aufklärung des Systems der menschlichen Leukozytenantigene.
1958 beschrieb DAUSSET (25) das erste Leukozytenantigen MAC (heute : HLA-A2). Mit umfangreichen statistischen Analysen gelang VAN ROOD 1962 (82) aus den verschiedenen Reaktionsmustern, die die zu testenden Seren gegenüber den verschiedenen Leukozytensuspensionen ergaben, die Definition eines Gens, das er FOUR (heute : HLA-B) nannte, mit den Allelen 4a und 4b (heute : Bw4 und Bw6).
Über ähnliche Korrelationsuntersuchungen bestimmter Reaktionsmuster von Seren ermittelten PAYNE et al. 1964 (74) einen vom FOUR-Genlocus unabhängigen Genort, IA (heute : HLA-A), mit drei Allelen. Der Zwei- bzw. Drei-Allelen Polymorphismus konnte in der Folgezeit nicht mehr aufrecht erhalten werden. Vielmehr zeigte sich, daß an beiden Genorten multiple Allelie vorliegt. Durch den Einsatz von Computerprogrammen verlief die serologische Identifi-

zierung einer großen Anzahl von Spezifitäten, die jeweils zu einem der beiden Loci gehörten, relativ rasch, und auch das genetische System konnte durch DAUSSET et al. (26) sowie CEPPELLINI et al. (19) aufgeklärt werden. Das Nomenklaturkomitee der WHO gab ihm die offizielle Bezeichnung HLA (= Human Leucocyte Antigen oder Human Leucocyte System A). 1970 beschrieben SANDBERG et al. (87) ein drittes, zum HLA-System gehörendes Gen, AJ (heute: HLA-C), dessen Existenz von SVEJGAARD et al. (95) bestätigt wurde.

1.2. Der MHC des Menschen

Der intensiven Forschungsarbeit zahlreicher Institute und der internationalen Zusammenarbeit auf den Histokompatibilitäts-Workshops ist es zu verdanken, daß innerhalb relativ kurzer Zeit nicht nur das Chromosom, auf dem die HLA-Gene lokalisiert sind, ermittelt werden konnte, sondern auch die enge chromosomale Beziehung anderer immunologisch bedeutsamer Gene.
Diese ebenfalls zum HLA-System zu rechnenden Gene liegen mit den klassischen HLA-Genen, HLA-A,B und C, eng gekoppelt auf einem kurzen Chromosomensegment des Autosoms C6. Dieser Genkomplex wird auch als Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC = Major Histocompatibility Complex) des Menschen bezeichnet. Alle zum MHC gehörenden Gene spielen wahrscheinlich eine wesentliche Rolle bei der Definition von "selbst" und der Erkennung von "fremd". Der MHC, der bei fast allen Vertebraten einen ähnlichen Aufbau zeigt (42a),wird bei der Maus H-2 und beim Hund DLA genannt. Der Genkomplex des HLA-Systems

umfaßt, soweit heute bekannt, Gene für:

a) die "klassischen" serologisch definierbaren HLA-Antigene
b) die lymphozytär definierbaren HLA-Antigene
c) die serologisch definierbaren B-zellspezifischen HLA-Antigene
d) die Bildung von Proteinen, die dem Komplementsystem angehören
e) die Ausprägung der erythrozytären Merkmale Chido und Rodgers

Zwischen den Genen des HLA-Systems liegt ein starkes Kopplungsungleichgewicht vor, d.h. daß einzelne Genkombinationen häufiger oder seltener an einem Chromosom vorkommen, als dies nach den Einzelfrequenzen zu erwarten wäre.

1.2.1 HLA-A,B,C

Die serologisch definierbaren Antigene des HLA-Systems, die mit quantitativen Unterschieden an allen menschlichen Zellen vorkommen (42b), werden von drei eng gekoppelten Genloci codiert: Locus A, Locus B und Locus C. Trotz der engen Kopplung sind Rekombinationen beobachtet worden (52), mit deren Hilfe die Reihenfolge der drei Gene auf dem Chromosom 6 ermittelt werden konnte (13) :HLA-A :: HLA-C :: HLA-B. Die Rekombinationswerte (Rk-Werte), die als Maßzahlen für gegenseitige Genabstände gelten, betragen nach Untersuchungen von BODMER (13) sowie HILLER et al. (45) zwischen HLA-A :: HLA-C 0,6%, zwischen HLA-C :: HLA-B 0,2% und zwischen HLA-A :: HLA-B 0,8% (Abb. 1).

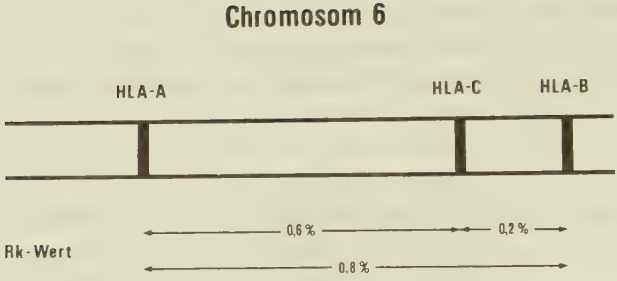

Abb. 1 : Anordnung und Rekombinationswerte der Genloci HLA-A,B und C auf dem Chromosom 6

An allen drei Genloci liegt multiple Allelie vor. Die Zahl der Allele eines Locus erhöhte sich im Laufe der Jahre nicht nur durch die Gewinnung neuer Antiseren, die bis dahin unbekannte Antigene definieren konnten, sondern auch durch spezifischere Antiseren, die bereits bekannte Antigene weiter aufzuteilen vermochten. Diese sog. "public"-Antigene sind aus zwei oder mehreren "split"- oder "private"-Antigenen zusammengesetzt, von denen jedes für sich serologisch definiert werden kann.

Nach der WHO-Nomenklatur von 1977 sind vom ersten Locus (HLA-A) 17, vom zweiten (HLA-B) 27 und vom dritten (HLA-C) 6 Allele bekannt (Tab.1). Da noch nicht alle Genprodukte nachweisbar sind, gibt es sog. "Blancs"- oder "X"-Gene.
Eine Gegenüberstellung der Allelfrequenzen der häufigsten HLA-A,B,C-Antigene, sowie der "Blancs" gibt die Abbildung 2 wieder.

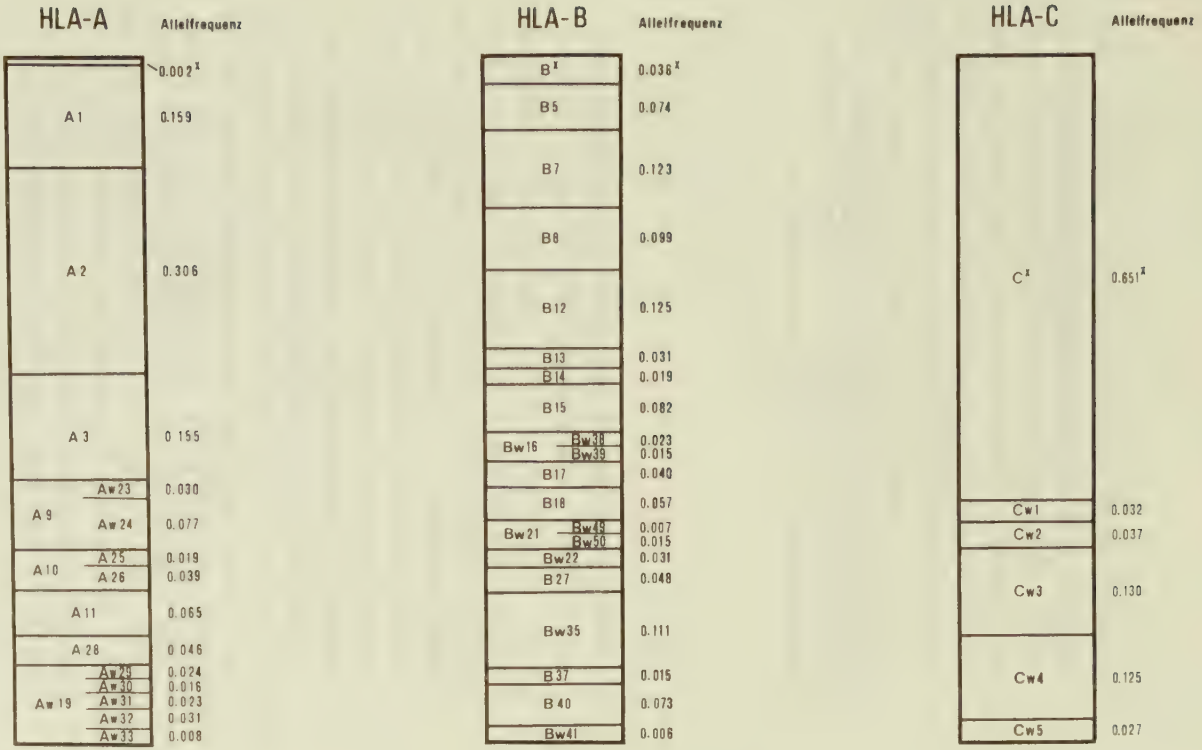

Abb. 2: Allelfrequenzen der häufigsten HLA-A, B und C-Antigene mit "blanks" nach (45)

Jedes diploide Individuum besitzt sechs Gene für die serologisch definierbaren Merkmale des HLA-Systems. Je nachdem, ob es für ein oder mehrere Merkmale homozygot oder heterozygot ist, sind in seinem Phänotyp mindestens drei und maximal sechs verschiedene Antigene nachweisbar. Aus der großen Zahl möglicher Antigenkombinationen ergibt sich ein Polymorphismus, wie er bisher bei keinem anderen genetisch determinierten Merkmalsystem beim Menschen bekannt ist.

1.2.2 HLA-D

Während die Antigene der Loci HLA-A,B und C mit spezifischen Antiseren nachweisbar sind, lassen sich die Determinanten des Locus HLA-D lediglich in der sog. "gemischten Lymphozytenkultur" (MLC = Mixed Lymphocyte Culture) bestimmen. Dieser von HIRSCHHORN et al. (46) zuerst durchgeführte Test beruht im Prinzip darauf, daß sich die Lymphozyten zweier Individuen derselben Spezies als fremd erkennen und gegenseitig zur Transformation in teilungsfähige Lymphoblasten anregen, wenn sie sich in gewissen antigenen Determinanten unterscheiden. Sind diese antigenen Determinanten gleich, erfolgt selbst bei genetisch unterschiedlichen Individuen keine Transformation. YUNIS, AMOS (113) und MEMPEL (63) konnten zeigen, daß die Zellproliferation keine Reaktion auf die serologisch definierten Histokompatibilitätsantigene ist, sondern auf Antigene, die von einem separaten Genort codiert werden. Dieser vom WHO-Nomenklaturkomitee 1977 (68) als HLA-D bezeichnete Locus liegt eng gekoppelt mit den klassischen HLA-Loci auf der Seite des HLA-B

Genortes. Die Rekombinationsfrequenz mit HLA-B beträgt nach BODMER (13) 0,8% (Abb. 3).

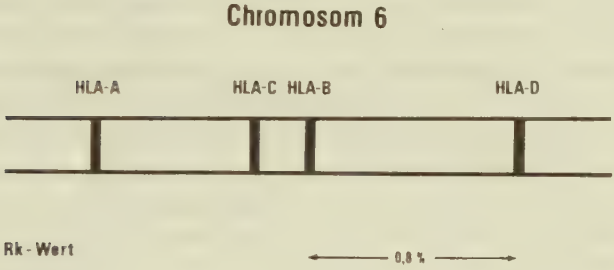

Abb. 3 : Beziehung des HLA-D-Locus zu den drei klassischen Loci der HLA-Region

Bislang sind 11 Allele dieses Locus definiert und mit Dw 1 bis Dw 11 bezeichnet worden (Tab.1). Neben diesem "major" HLA-D-Locus existiert ein zweiter sog. "minor" Locus, der allerdings noch nicht genau lokalisiert werden konnte (90). Differenzen der Genprodukte dieses Locus bewirken in der gemischten Lymphozytenkultur nur eine geringgradige Stimulation.
BACH et al. (10) haben den MLC-Test in entscheidender Weise modifiziert, indem sie eine der beiden Zellpopulationen durch Mitomycin bzw. Bestrahlung inaktivierten und auf diese Weise eine gerichtete Stimulation (one way stimulation) der unbehandelten Lymphozytenpopulation erreichten (Abb. 4).

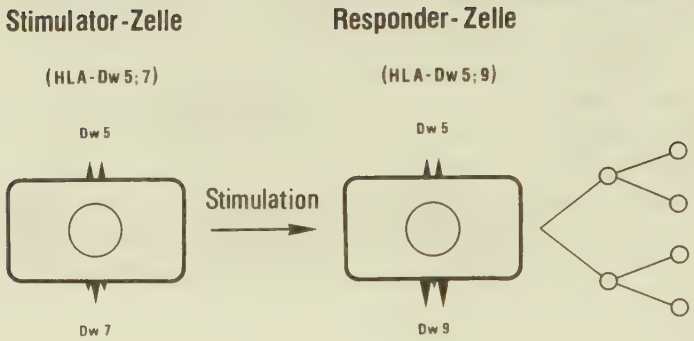

Abb. 4 : Prinzip der Einwegstimulation nach BACH et al. 1966

Die Stimulator-Zelle wird durch Mitomycin oder Bestrahlung an der Proliferation gehemmt. Die Responder-Zelle erkennt das fremde HLA-D-Antigen (im Beispiel HLA-Dw 7) und reagiert mit Zellteilung. Der Grad der Zellproliferation wird an der Einbaurate von radioaktiv markiertem Thymidin in die DNA der Zellen gemessen.

1.2.3 HLA-DR

Nach der Identifizierung einzelner HLA-D Allele mit dem HTC-Test, bei dem HLA-D homozygote Zellen zur Typisierung eingesetzt wurden (32,64), versuchten vor allem VAN LEEUWEN et al. (57), die gleichen Antigene serologisch zu definieren. Sie fanden Antiseren, die in der Lage waren, die MLC-Reaktion zu hemmen. Anders als die gegen HLA-A,B,C Antigene

gerichteten Antikörper ließen sich die in diesen Seren enthaltenen MLC-blockierenden Antikörper nicht durch Thrombozyten absorbieren. In Analogie zu den Ergebnissen, die bei der Maus mit MLC-hemmenden Seren erhalten worden waren (86), konnten VAN LEEUWEN et al. (57) mit einem aufwendigen Immunfluoreszenstest auch beim Menschen zeigen, daß die Antikörper nur mit Strukturen auf B-Lymphozyten reagieren. Bei der Maus konnte zudem der Genort definiert werden, der diese B-zellspezifischen Antigene determiniert. Er liegt innerhalb der I-Region des Haupthistokompatibilitätskomplexes der Maus. Beim Menschen ist bislang noch ungeklärt, ob diese serologisch definierbaren Antigene den HLA-Determinanten entsprechen oder von einem dem HLA-D-Locus eng gekoppelten Genort codiert werden.

In Anlehnung an die Befunde bei der Maus wurden diese B-zellspezifischen Antigene Ia-Antigene (I-associated) genannt. Das Nomenklaturkomitee (68) hat für den mit Hilfe der Ia-Serologie ermittelten Polymorphismus ein vorläufig eigenes Symbol gewählt und zwar DR (D-related). Bisher wurden 7 Allele definiert und mit DRw 1 bis DRw 7 bezeichnet (Tab.1).

1.2.4 Gene für Komplement-Komponenten

Innerhalb des menschlichen Haupthistokompatibilitätssystems befinden sich noch Gene für die Codierung der klassischen Komplement-Komponenten C2 und C4 sowie des Faktors Bf (Bf = C3-Proaktivator) der alternativen Komplementaktivierung (38,100,6).

1.2.5 Gene für erythrozytäre Merkmale

Die beiden Erythrozyten- und Plasmaantigene Chido (1967 von HARRIS et al.[44] entdeckt) und Rodgers (1975 von LONGSTER et al.[60] beschrieben) werden von jeweils einem Gen innerhalb der HLA-Region codiert. Untersuchungen von GEDDE-DAHL et al. (39,40) zeigten, daß diese Gene wahrscheinlich in der unmittelbaren Nähe von HLA-B und Bf (= C3-Proaktivator) lokalisiert sind.

HLA-A	HLA-B		HLA-C	HLA-D	HLA-DR
HLA-A1	HLA-B5	HLA-Bw44	HLA-Cw1	HLA-Dw1	HLA-DRw1
HLA-A2	HLA-B7	HLA-Bw45	HLA-Cw2	HLA-Dw2	HLA-DRw2
HLA-A3	HLA-B8	HLA-Bw46	HLA-Cw3	HLA-Dw3	HLA-DRw3
HLA-A9	HLA-B12	HLA-Bw47	HLA-Cw4	HLA-Dw4	HLA-DRw4
HLA-A10	HLA-B13	HLA-Bw48	HLA-Cw5	HLA-Dw5	HLA-DRw5
HLA-A11	HLA-B14	HLA-Bw49	HLA-Cw6	HLA-Dw6	HLA-DRw6
HLA-Aw19	HLA-B15	HLA-Bw50		HLA-Dw7	HLA-DRw7
HLA-Aw23	HLA-Bw16	HLA-Bw51		HLA-Dw8	
HLA-Aw24	HLA-B17	HLA-Bw52		HLA-Dw9	
HLA-A25	HLA-B18	HLA-Bw53		HLA-Dw10	
HLA-A26	HLA-Bw21	HLA-Bw54		HLA-Dw11	
HLA-A28	HLA-Bw22		Splitantigene :		
HLA-A29	HLA-B27	HLA-Bw4	HLA-A9 → HLA-Aw23, Aw24		
HLA-Aw30	HLA-Bw35	HLA-Bw6	HLA-A10 → HLA-A25, A26		
HLA-Aw31	HLA-B37		HLA-B5 → HLA-Bw51, Bw52		
HLA-Aw32	HLA-Bw38		HLA-B12 → HLA-Bw44, Bw45		
HLA-Aw33	HLA-Bw39		HLA-Bw16 → HLA-Bw38, Bw39		
HLA-Aw34	HLA-B40		HLA-Bw21 → HLA-Bw49, Bw50		
HLA-Aw36	HLA-Bw41		HLA-Aw19 → HLA-A29, Aw30,		
HLA-Aw43	HLA-Bw42		Aw31, Aw32, Aw33		

Tab. 1 : Vollständige Liste der bekannten HLA-Spezifitäten nach der WHO-Nomenklatur von 1977 (68)

1.3 Der Haplotyp als Vererbungseinheit

Die HLA-Antigene werden wie einfache Mendel'sche Merkmale kodominant vererbt. Infolge der eng benachbarten Lage der HLA-Genloci auf dem Chromosom erfolgt ihre Vererbung in der Regel gemeinsam. Eine solche Vererbungseinheit wird auf Vorschlag von CEPPELLINI et al. 1967 (19) Haplotyp genannt.

Jedes Individuum besitzt entsprechend den diploiden Autosomen zwei Haplotypen, von jedem Elternteil einen, so daß die auf dem einen Chromosom verankerten Informationen vom Vater und die auf dem zweiten homologen Chromosom von der Mutter stammen. Bei den Kindern sind daher, Rekombinationen ausgenommen, nur vier verschiedene Genkombinationen möglich : a/c, a/d, b/c, b/d (Abb. 5)

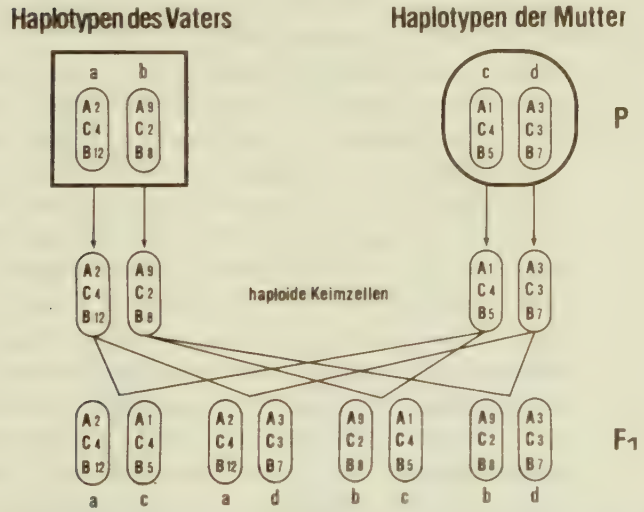

Abb. 5 : Schematische Darstellung des Erbgangs der HLA-Antigene, bei Betrachtung nur der Determinanten der Loci HLA-A, B und C

1.4 Die Bedeutung des HLA-Systems

1.4.1 HLA und Transplantation

Die zur Zeit wohl größte klinische Bedeutung hat das HLA-System auf dem Gebiet der Organ- und Knochenmarkstransplantation. 1966 erkannten VAN ROOD et al. (83), daß bei ABO-Kompatibilität die Genprodukte des HLA-Komplexes die wichtigsten Parameter für den Erfolg oder Mißerfolg einer Transplantation darstellen. Weitere Untersuchungen anderer Autoren (72,27) bestätigten, daß mit dem Grad der genetischen Verwandtschaft im HLA-System zwischen Spender und Empfänger die Überlebensdauer von Haut- und Nierentransplantaten steigt. Die besten Transplantationserfolge lassen sich bei Geschwistern erzielen, die identische HLA-A,B,C Antigene besitzen (47), während die Erfolgsaussichten bei unverwandten HLA-A,B,C identischen Empfänger-Spender Paaren wesentlich geringer ist. Daraus kann man schließen, daß die serologisch definierten HLA-Antigene für den Transplantationserfolg nicht so bedeutsam sind, wie andere Gene des HLA-Systems, deren Produkte zur Zeit noch nicht nachweisbar sind, und die bei HLA-A,B,C identischen Geschwistern in der Regel auch übereinstimmen. Zahlreiche Untersuchungen belegen (84,53), daß besonders die Identität der HLA-D Antigene einen großen Einfluß auf den Erfolg einer Organverpflanzung hat. Allerdings kann für die Transplantation von Leichenorganen die Bestimmung der HLA-D Antigene bislang nicht durchgeführt werden, weil die Überlebenszeit gekühlter Leichenorgane kürzer ist, als die für das Testverfahren benötigte Zeit.

Durch die Einführung eines serologischen Tests zur Bestimmung der HLA-DR-Antigene (85),die möglicherweise mit den HLA-D-Antigenen identisch sind, erhofft man sich für die Zukunft größere Erfolge bei der Organtransplantation, da sich die HLA-DR-Antigene noch innerhalb der Überlebenszeit von Leichenorganen bestimmen lassen.
Unter den Transplantationen nehmen die Knochenmarkstransplantationen eine Sonderstellung ein. Da es sich um die Übertragung immunkompetenter Zellen handelt, besteht die große Gefahr der Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (Graft-versus-host-reaction, GvH-Reaktion). Deshalb muß hier ein besonders hoher Grad an Histokompatibilität gefordert werden, der sich praktisch nur zwischen HLA-identischen Geschwistern finden läßt (103). Da selbst bei MHC-Identität zwischen Spender und Empfänger, d.h. auch bei HLA-identischen Geschwistern, noch geringe Abstoßungsreaktionen vorkommen können (78), nimmt man die Existenz zusätzlicher "minor" Histokompatibilitätssysteme an, die nicht HLA-gekoppelt, sondern auf anderen Chromosomen lokalisiert sind.

1.4.2 HLA und Transfusion

Trotz Übereinstimmung in den erythrozytären Blutgruppenmerkmalen kann es bei Transfusionen zu febrilen Transfusionsreaktionen kommen, die sich zum größten Teil auf Antikörper des Empfängers zurückführen lassen, die gegen die Spenderleukozyten gerichtet sind (17). Dabei wiederum stehen Immunisierungen gegen HLA-Spezifitäten im Vordergrund, während Antikörper gegen granulozyten- oder thrombozytenspezifische Merkmale eine geringere Bedeutung

haben (43). Betroffen sind vor allem Patienten mit hämatologischen Erkrankungen, die wiederholter Bluttransfusionen bedürfen. Typisch ist, daß die erste Transfusionsreaktion relativ spät, d.h. nach einer hohen Zahl bereits verabfolgter Bluttransfusionen auftritt. Eine Ausnahme bilden primi- und multipare Frauen, wie eine Studie von PAYNE und ROLFS (75) gezeigt hat. Sie können, bereits früher durch fetale Leukozyten sensibilisiert, schon bei ihrer ersten Bluttransfusion eine Transfusionsreaktion zeigen. Aus diesem Grunde sind Frauen im allgemeinen häufiger von Transfusionszwischenfällen betroffen als Männer.

Die Schwere des Zwischenfalls ist von der Menge transfundierter Leukozyten abhängig (17). Patienten, die Vollblut bekommen, zeigen allgemein schwächere Reaktionen als Patienten mit z.B. Neutropenie, bei denen wegen der hohen Zahl transfundierter Leukozyten lebensbedrohliche Zustände eintreten können. Zur Vermeidung dieser Reaktionen kann entweder leukozytenarmes Blut verwendet, oder auf HLA-kompatible Spender zurückgegriffen werden. Auf Grund des extremen Polymorphismus des HLA-Systems ist die Transfusion leukozytenarmen Blutes praktikabler. Sollen allerdings häufiger Leukozyten- oder Thrombozytenkonzentrate übertragen werden, so muß der Spender zumindest für die Loci HLA-A und B kompatibel sein, da HLA-identische Blutbestandteile länger im transfundierten Patienten überleben als HLA-ungleiche Zellen (112). Treten auch dann noch Transfusionsreaktionen auf, so muß nach Antikörpern gegen granulozyten- oder thrombozytenspezifischen Merkmalen gesucht werden.

1.4.3 HLA und Erkrankungen

Eine besondere Bedeutung hat das HLA-System bekommen, seit AMIEL 1967 (7) die erste Assoziation einer Erkrankung (M. Hodgkin) mit bestimmten HLA-Antigenen beschrieb. Obwohl trotz zahlreicher Studien bis heute nicht eindeutig geklärt werden konnte, mit welchem Antigen der Morbus Hodgkin assoziiert ist (8 ,54,55, 37), gab diese Publikation Anstoß für weitere Untersuchungen. Mittlerweile konnten für eine Reihe von Erkrankungen mehr oder weniger starke Assoziationen mit verschiedenen HLA-Antigenen nachgewiesen werden (Tab. 2).

Krankheiten	HLA-Antigen	rel. Risiko
M. Bechterew	B 27	90,0
M. Reiter	B 27	35,9
Iridozyklitis	B 27	9,4
Multiple Sklerose	B 7 Dw 2	1,7 4,3
Myasthenia gravis	B 8 Dw 3	4,4 2,3
Psoriasis vulgaris	B 13 Bw 17 Bw 37	4,7 4,7 6,4
Zöliakie	B 8 Dw 3	8,6 73,0
Diabetes juvenilis	B 8 Dw 3 Dw 4	2,4 3,8 3,5

Tab. 2 : HLA assoziierte Krankheiten
Auszug aus SVEJGAARD und RYDER 1977 (99)

Auffallend ist, daß die Assoziationen fast ausschließlich Antigene des B-Locus betreffen. Die von BREWERTON et al. (16) und SCHLOßSTEIN et al. (88) festgestellte Assoziation zwischen der ankylosierenden Spondylitis (M. Bechterew) und HLA-B 27 ist so ausgeprägt, daß heute bei gegebenem Verdacht die Untersuchung auf HLA-B 27 als diagnostische Hilfe herangezogen wird.

Zur Erklärung des Phänomens der Assoziation von HLA-Antigenen und Erkrankungen dienen vor allem Befunde von ZINKERNAGEL und DOHERTY (114), wonach die HLA-Antigene entscheidend für die Kooperation der immunkompetenten Zellen sind. Außerdem vermutet man in Analogie zur Maus in der HLA-Region Immunantwortgene, die durch eine verringerte Immunantwort auf ein pathogenes Agens zu Assoziationen zwischen HLA-Antigenen und bestimmten Krankheiten führen könnten.

1.4.4 HLA in der Paternitätsserologie

Das HLA-System ist in besonderem Maße für die Paternitätsserologie geeignet, da es alle Kriterien, die in der forensischen Medizin von einem Merkmalsystem gefordert werden, hervorragend erfüllt :

a) Es ist ein genetisch determiniertes System mit gesichertem Erbgang.
b) Das Merkmal ist bereits beim Neugeborenen vorhanden und bleibt lebenslang konstant.
c) Durch die weitgehend standardisierten Typisierungsmethoden ist das Nachweisverfahren reproduzierbar.

Von besonderem Wert ist zudem der extreme Polymorphismus, der die Ausschlußwahrscheinlichkeit für Nichtväter auf $> 99{,}6\%$ (61) erhöht.

2. HLA-SEROLOGIE

2.1 Quellen für HLA-Antiseren

Für eine exakte Typisierung der serologisch definierten HLA-Antigene, sowohl der HLA-A,B,C-Antigene als auch der B-zellspezifischen HLA-DR-Antigene, sind serologisch reaktionsstarke Antiseren erforderlich, die nur eine oder wenige HLA-Spezifitäten definieren. Die Tatsache, daß fast alle Antiseren kreuzreagierende Antikörper in unterschiedlich hoher Konzentration (lytisch oder sublytisch) enthalten (22,67), macht die Gewinnung solcher Seren außerordentlich schwierig. Zudem sind die zur HLA-Typisierung geeigneten Antiseren häufig nicht in ausreichender Menge zu bekommen.
Um diesen Schwierigkeiten zu begegnen, hat man alle bisher zur Verfügung stehenden HLA-Antikörperquellen zur Antiserumgewinnung herangezogen, wobei jedoch die praktische Bedeutung dieser einzelnen Möglichkeiten unterschiedlich ist.
Die vier Hauptquellen für HLA-Antiseren sind :

1) schwangere, primi- oder multipare Frauen
2) polytransfundierte Patienten
3) freiwillig Immunisierte
4) immunisierte Schimpansen oder Kaninchen

2.1.1 HLA-Antiseren von schwangeren, primi- oder multiparen Frauen

Für die Gewinnung von HLA-Antiseren in großem Maßstab verwendet man heute fast ausschließlich

Schwangerenseren, da sie

a) die am leichtesten zugängliche Quelle darstellen,und
b) auf Grund der genetisch bedingten geringeren Antigenunterschiede zwischen Mutter und Kind mit größerer Wahrscheinlichkeit Antikörper von eingeengter Spezifität enthalten, als Seren von Individuen, die durch Zellen Unverwandter immunisiert worden sind, wie z.B. Seren polytransfundierter Patienten.

Etwa 10-25% aller Graviden entwickeln zytotoxische HLA-Antikörper gegen die als fremd erkannten, vom Vater vererbten HLA-Antigene ihrer Kinder (101,104,91). Diese Antikörper sind relativ stabil und bleiben oft noch Monate nach der Entbindung nachweisbar (105). Von diesen antikörperhaltigen Seren ist allerdings nur ein geringer Prozentsatz für Zwecke der HLA-Bestimmung geeignet. Der weitaus größte Teil dieser zytotoxischen HLA-Antiseren enthält nämlich Antikörpergemische und / oder kreuzreagierende Komplexe bzw. zeigt eine ungenügende Reaktionsstärke. Man muß demzufolge eine große Anzahl Schwangerenseren untersuchen, um eine kleine Zahl für die HLA-Typisierung geeigneter Antiseren zu erhalten. Ein routinemäßiges Screening aller Schwangerenseren kurz vor oder nach der Entbindung an Kliniken mit einem HLA-Labor bietet sich dazu an.

2.1.2 HLA-Antiseren von polytransfundierten Patienten

Wie in dem Abschnitt "HLA und Transfusion" bereits beschrieben, bilden polytransfundierte Patienten häufig Antikörper gegen die fremden HLA-Antigene des Spenders. Die Wahrscheinlichkeit, bei einem solchen Patienten ein mono- oder duospezifisches reaktionsstarkes HLA-Antiserum zu finden, ist aber verhältnismäßig gering (36), bzw. kann nur dann erwartet werden, wenn dem Patienten das Blut nur eines Spenders

transfundiert wird. Sobald jedoch mehrere Blutspender hinzugezogen werden, sind die gebildeten Antikörper meist polyspezifisch und daher für die HLA -Typisierung ungeeignet. Aus diesem Grunde ist dieses Verfahren der HLA-Antiserumgewinnung heute weitgehend verlassen worden.

2.1.3 HLA-Antiseren von freiwillig immunisierten Personen

Bei der geplanten Immunisierung wird versucht, gezielt die Bildung eines Antikörpers gegen ein spezifisches HLA-Antigen bei der immunisierten Person zu induzieren. Dieses Verfahren dient vor allem der Beschaffung von Antiseren, die bei der natürlichen Immunisierung durch Schwangerschaft selten gefunden werden, aber auch dem Versuch der Produktion von Antiseren gegen bisher unbekannte HLA-Spezifitäten. Die Wahrscheinlichkeit, bei einer Schwangeren eine Immunisierung gegen eine neue HLA-Spezifität zu entdecken, ist gering, da in diesen Seren häufig auch noch Antikörper gegen bekannte Antigene vorkommen, die das Serum oligo- oder polyspezifisch machen (36). Daher ist die geplante Immunisierung freiwilliger Personen, obwohl mit gewissen gesundheitlichen Risiken verbunden, eine geeignete Methode, die in einigen Fällen zur Definition neuer HLA-Antigene geführt hat (58). Von Vorteil ist außerdem, daß ein für die HLA-Typisierung geeignetes Antiserum in ausreichender Menge gewonnen werden kann.
Die Immunisierung erfolgt :

a) durch Hauttransplantation
b) durch subkutane Injektion gereinigter Leukozyten -Thrombozytensuspensionen
c) durch Bluttransfusionen

Ebenso kann eine Immunisierung durch die Kombination dieser drei Möglichkeiten erreicht werden.
Aus ethischen Gründen haben sich in Deutschland solche Verfahren der HLA-Antiserumgewinnung nicht durchgesetzt.

2.1.4 HLA-Antiseren von immunisierten Schimpansen und Kaninchen

Die großen Schwierigkeiten bei der Gewinnung von monospezifischen Alloantiseren für die HLA-Typisierung haben zu erfolgreichen Versuchen der Sensibilisierung von Tieren gegen menschliche HLA-Determinanten geführt. Diese heterologen HLA-Antiseren, die in der Lage sind, selektiv mit humanen HLA-Antigenen zu reagieren, werden hauptsächlich durch die Immunisierung von Schimpansen und Kaninchen gewonnen (33,50).
Als Antigenmaterial werden dabei in der Regel gereinigte, gelöste humane Lymphozytenmembranfraktionen verwendet. Die auf diese Weise erhaltenen Antiseren müssen anschließend mit Lymphozyten absorbiert werden, die keine HLA-Spezifität mit den Immunisierungslymphozyten gemein haben, um andere nicht HLA-spezifische Heteroantikörper zu entfernen.
Dieses Verfahren der HLA-Antiserumgewinnung findet allerdings nur beschränkte Anwendung, da die Herstellung des für die Immunisierung benötigten Antigenmaterials außerordentlich schwierig ist.

2.2 Serologische Kreuzreaktionen im HLA-System

Wie bereits erwähnt, ist eine der größten Schwierigkeiten, auf die man bei der serologischen Bestimmung von HLA-A,B,C-Antigenen stößt, die Tatsache, daß die in zytotoxischen HLA-Antiseren enthaltenen Antikörper häufig mit mehr als einem HLA-Antigen reagieren. Dieser Mangel an Spezifität ist meist nicht auf die Anwesenheit mehrerer monospezifischer Antikörper im Serum zurückzuführen, sondern auf die Existenz kreuzreagierender Antikörper, die unabhängig von der Immunisierungsart auftreten (42c). Die Seren enthalten dann neben dem spezifischen Antikörper gegen das homologe HLA-Antigen, mit dem immunisiert worden ist, auch noch Antikörper gegen sogenannte kreuzreagierende Antigene, die auf den immunisierenden Leukozyten nicht vorhanden waren.

2.2.1 Kreuzreagierende Antigengruppen

Das Phänomen der serologischen Kreuzreaktionen wurde erstmals 1968 von SVEJGAARD und KISSMEYER-NIELSEN (96) beschrieben.
Interessant waren vor allem Beobachtungen aus Immunisierungsexperimenten, bei denen die Empfänger-Spender Paare auf den Loci A und B bekannte Spezifitäten trugen, die sich nur in einer unterschieden, und das Serum des Empfängers trotzdem mit mehreren HLA-Antigenen reagierte.

Beispiel: Empfänger HLA-A2, A3, B8, B12
Spender HLA-A2, A3, B5, B12

Reaktionen des Antiserums erfolgten wider Erwarten

nicht nur mit HLA-B5 positiven Zellen, sondern auch mit Zellen, die positiv waren für HLA-Bw35, B15, B18. Die Antigene HLA-B5, Bw35, B15 und B18 wurden daraufhin zu einer Gruppe kreuzreagierender Antigene zusammengeschlossen.
Mittlerweile konnten fast alle Spezifitäten eines Locus einem Paar oder einer Gruppe kreuzreagierender Antigene zugeordnet werden (42c). Die Stärke der Kreuzreaktivität bei den einzelnen Gruppen ist allerdings sehr unterschiedlich. Am häufigsten werden kreuzreagierende Antikörper gegen folgende Antigengruppen beobachtet (65, 5) :

Locus A : HLA-A1, A3, A11
HLA-A1, A10, A11
HLA-A10, Aw19
HLA-A2, A9
HLA-A2, A28

Locus B : HLA-B5, Bw35, B15, B18
HLA-B7, Bw22, B40, B27
HLA-B13, B40
HLA-B8, B14

Besonders ausgeprägt sind Kreuzreaktionen zwischen HLA-A9 bzw. HLA-A10 und ihren "Untergruppen" Aw23, Aw24 bzw. A25, A26 sowie zwischen den Split-Antigenen des HLA-Aw19 Komplexes.
Bisher sind Kreuzreaktionen nur zwischen den Antigenen eines Locus, niemals zwischen den Antigenen verschiedener Loci beschrieben worden.

2.2.2 Konzept der molekularen Grundlage der Kreuzreaktionen

Zur Erklärung der serologischen Kreuzreaktionen wurde eine 1966 von IVANYI und DAUSSET aufgestellte Hypothese (48), wonach HLA-Antigene aus verschiedenen antigenen Faktoren zusammengesetzt sein sollen, aufgegriffen und zu einem Modell für die molekulare Basis der Kreuzreaktionen erweitert (5). Die Hypothese IVANYIs und DAUSSETs konnte mittlerweile durch differenzierte Absorptions - und Hemmungsstudien (59), "capping"-Methoden (56) und biochemische Untersuchungen (94) bestätigt werden.
Diese Untersuchungen haben ergeben, daß die Antigene der drei Genloci HLA-A, B, C aus zwei Polypeptidketten bestehen, einer schweren (MG 43000) und einer leichten (MG 12000). Nur die schwere Kette wird von den HLA-A, B, C Genen kodiert und trägt somit die serologisch nachweisbaren Determinanten. Die leichte Kette (β_2-Mikroglobulin) ist scheinbar nicht polymorph und wird von einem Gen auf dem Chromosom 15 determiniert (Abb. 6).

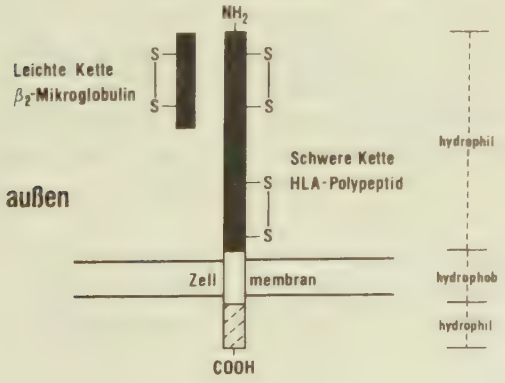

Abb. 6: Strukturschema der HLA-Antigene nach (94)

Das HLA-Makromolekül setzt sich, wie viele andere Polypeptide, aus verschiedenen antigenen Determinanten mit unterschiedlicher Immunogenität (5) zusammen. Gegen diese Determinanten können Antikörper gebildet werden. Die Allele eines Locus unterscheiden sich in mindestens einer antigenen Determinante voneinander, die charakteristisch für dieses Antigen ist. Diese "subtypische" Determinante ist am stärksten immunogen. Andere, "supertypische" Determinanten des Moleküls, mit geringerer Immunogenität, können dagegen auch auf weiteren HLA-Antigenen vorkommen. Bei einer Immunisierung wird die "subtypische" Determinante zuerst erkannt und ein spezifischer Antikörper gebildet, z.B. spezifisch gegen HLA-B5. Wenn die Immunisierung andauert, wird auch eine weniger immunogene Determinante eine Antikörperbildung hervorrufen. Dieser Antikörper wird mit allen HLA-Antigenen, die diese "supertypische" Struktur tragen, reagieren, z.B. mit HLA-B5 und HLA-Bw35 positiven Zellen. Bei fortgesetzter Immunisierung werden mehr und mehr solcher "supertypischen" Strukturen erkannt und noch breiter reagierende Antikörper gebildet, d.h. positiv mit HLA-B5, Bw35, B15 bzw. mit HLA-B5, Bw35, B15 und B18 positiven Zellen.

Mit diesem erarbeiteten Modell lassen sich sehr viele Untersuchungsergebnisse erklären. Daß aber nicht alle Beobachtungen mit ihm in Einklang zu bringen sind, beweist, daß das Phänomen der serologischen Kreuzreaktionen wohl viel komplexer ist, als ursprünglich angenommen.

2.2.3 Kreuzreagierende Antiseren

Tatsächlich konnte mit differenzierten Absorptions - und Elutionsverfahren gezeigt werden, daß jedes kreuzreagierende Antiserum zwei oder mehrere Antikörperpopulationen mit verschiedenen Spezifitäten enthält (22,42c).Verdünnungsexperimente mit solchen Seren haben ergeben, daß die im Serum enthaltenen Antikörper unterschiedlich hohe Titer haben (5 ,22), wobei der spezifische Antikörper den höchsten Titer besitzt.
Das Gemisch der verschiedenen Antikörperpopulationen in einem kreuzreagierenden Antiserum kann schematisch etwa so dargestellt werden (Abb. 7) :

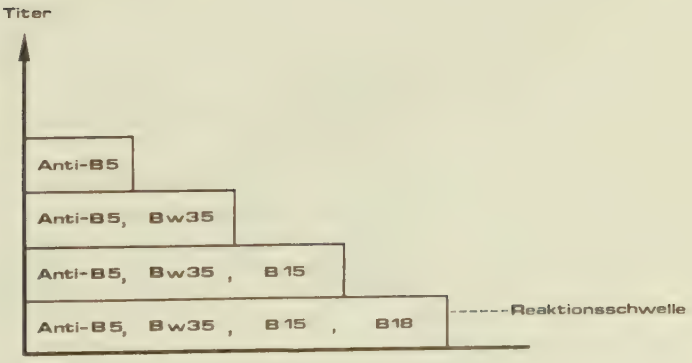

Abb. 7 : Gemisch aus vier verschiedenen Antikörperpopulationen in einem kreuzreagierenden Antiserum

Die Identifizierung des spezifischen Antikörpers kann erfolgen durch:

a) Verdünnung
b) Absorption und Elution

ad a) Durch sukzessive Verdünnung kann der spezifische Antikörper, der wie bereits erwähnt den höchsten Titer besitzt, in lytischer Konzentration im Serum zurückbehalten werden, während die kreuzreagierenden Begleitantikörper, bei denen mit der Spezifität auch der Titer abnimmt, in sublytischen Konzentrationen zurückbleiben (Abb. 8).

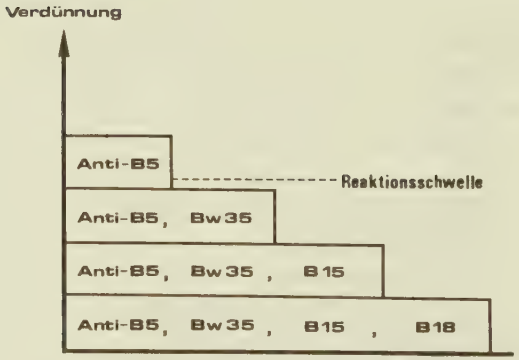

Abb. 8 : Identifizierung des spezifischen HLA -Antikörpers in einem kreuzreagierenden Antiserum durch Verdünnung

Aus dem oligospezifischen Serum (Anti-B5 + Anti-Bw35 + Anti-B15 + Anti-B18) wird ein funktionell (22) monospezifisches Serum.

ad b) Wird das Serum stufenweise mit geeigneten Thrombozyten (=Thrombozyten, die nur ein Antigen tragen, gegen das das Serum Antikörper enthält) absorbiert, so können die einzelnen Antikörperpopulationen voneinander getrennt und anschließend wieder ausgewaschen werden. Die Identifizierung des spezifischen Antikörpers geschieht über die im absorbierten Serum enthaltenen Restspezifitäten (Abb. 9).

Absorbierende Spezifität	Restspezifitäten des absorbierten Serums	Spezifitäten des Eluats
B18	B5+Bw35+B15	B5+Bw35+B15+B18
B15	B5+Bw35	B5+Bw35+B15+B18
Bw35	B5	B5+Bw35+B15+B18
B5	----	B5+Bw35+B15+B18

Abb. 9 : Identifizierung des spezifischen HLA-Antikörpers in einem kreuzreagierenden Antiserum durch Absorption und Elution

Die Absorption mit HLA-B18 positiven Zellen entfernt nur einen Antikörper : 1. Anti-B5, Bw35, B15, B18.
Die Absorption mit HLA-B15 positiven Zellen entfernt zwei Antikörper : 1. Anti-B5, Bw35, B15, B18
2. Anti-B5, Bw35, B15.
Die Absorption mit HLA-Bw35 positiven Zellen entfernt drei Antikörper : 1. Anti-B5, Bw35, B15, B18
2. Anti-B5, Bw35, B15
3. Anti-B5, Bw35
und nur der spezifische Antikörper Anti-B5 bleibt als Restspezifität im Serum zurück.
Durch Absorption mit dem Antigen, das phänotypisch auf den immunisierenden Zellen vorhanden war, wird die gesamte Antikörperaktivität entfernt.

Da sich die HLA-Antikörper entsprechend dem von SVEJGAARD 1969 beschriebenem "Synergismus der HLA -Antikörper" (97) in ihrer zytotoxischen Wirkung addieren, liegen die einzelnen Antikörper nach ihrer Auftrennung häufig in sublytischen Konzentrationen vor. Es kann aber trotzdem ein monospezifischer Antikörper mit ausreichendem Titer für die HLA-Typisierung gewonnen werden, wenn nach Entfernung aller kreuzreagierenden Antikörper eine Absorption des spezifischen Antikörpers aus dem Serum mit anschließender Elution in einem geringeren Volumen durchgeführt wird (81).

2.2.4 Funktionell monospezifische Antiseren

Durch Konzentrierungsexperimente bzw. sehr sensible Testverfahren konnte auch nachgewiesen werden, daß in den als "monospezifisch" deklarierten Seren fast regelmäßig zusätzliche Antikörperpopulationen vorkommen (67,18). Viele dieser Antiseren, die sich im Zytotoxizitätstest "monospezifisch" verhalten, d.h. nur mit einer einzigen Antigenspezifität reagieren, lassen sich durch Zellen, die nicht das homologe sondern ein kreuzreagierendes Antigen tragen, absorbieren (65). Eine solche Reaktionsweise wird als CYNAP (cytotoxic-negativ-absorption-positiv) bezeichnet (96). Sie läßt sich erklären durch die Anwesenheit von einem oder mehreren kreuzreagierenden Antikörpern in sublytischen Konzentrationen (Abb. 10).

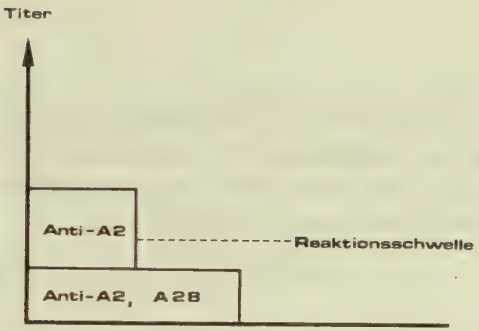

Abb. 10 : Funktionell monospezifisches Antiserum, mit einem zusätzlichen kreuzreagierenden Antikörper in sublytischer Konzentration

Durch Absorption des Serums mit HLA-A2 negativen, HLA-A28 positiven Zellen wird der "supertypische" Antikörper Anti-A2, A28 entfernt. Da sich, wie schon erwähnt, die in einem Serum befindlichen Antikörperpopulationen in ihrer zytotoxischen Wirkung addieren, fällt der verbleibende Antikörper Anti-A2 unter die Reaktionsschwelle. Eine Absorption mit HLA-A2 positiven Zellen entfernt die gesamte Antikörperaktivität.
Dieses Beispiel zeigt, daß sogar bei Erfüllung der Forderung WALFORDS, der postulierte, daß ein Serum dann als funktionell monospezifisch gilt, wenn die Absorption mit positiv reagierenden Zellen von mindestens 30 unverwandten Personen die gesamte Antikörperaktivität eliminiert, keineswegs gesichert ist, daß ein Serum nur eine Antikörperspezifität enthält(110).
Aus diesem Grunde wird man nahezu niemals zwei Antiseren einer Spezifität finden, die vollständig identisch reagieren.

Für die Praxis der HLA-Bestimmung ergibt sich daraus die Notwendigkeit, mindestens zwei Antiseren gleicher Spezifität von verschiedenen Spendern zur Typisierung einzusetzen.

2.2.5 Bedeutung der kreuzreagierenden Antigengruppen für die Antikörperbildung

Bei jeder Immunisierung kann der Empfänger Antikörper gegen alle antigenen Determinanten des Spenders bilden, die er auf seinen eigenen Zellen nicht trägt. Je mehr supertypische Determinanten Spender und Empfänger miteinander teilen, desto weniger Antikörper können gebildet werden, d.h. die Kreuzreaktivität hat einen Einfluß auf die Immunogenität der HLA-Antigene. Häufig bleibt die Immunantwort ganz aus. Mit welcher Wahrscheinlichkeit beim Empfänger auf die Immunisierung mit einem kreuzreagierenden Antigen keine Antwort erfolgt, wird mit der Methode nach COLOMBANI (21) ermittelt. Die Hemmung der Antikörperbildung ist allerdings nicht reziprok. Zum Beispiel ruft die Immunisierung eines HLA-Bw35 positiven Empfängers mit HLA-B5 positiven Zellen viel häufiger eine Antikörperbildung hervor, als umgekehrt die Immunisierung eines HLA-B5 positiven Empfängers mit Spenderzellen, die HLA-Bw35 tragen.
Dieses bisher ungeklärte Phänomen versucht man für die Organtransplantation auszunutzen (21).

3 METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER SPEZIFITÄT VON HLA-ANTISEREN

3.1 Geschichtlicher Rückblick

Mit der Beschreibung des ersten HLA-Antigens, MAC, durch DAUSSET 1958 (25) bzw. des diallelischen Systems, FOUR, durch VAN ROOD 1962 (82), begann eine intensive Forschungsarbeit mit dem Ziel, den angedeuteten Polymorphismus weiter aufzuklären. Die dabei von VAN ROOD angewandte Methode zur Identifizierung von Leukozytenantigenen bestand im Prinzip darin, daß zahlreiche Antiseren unbekannter Spezifität gegen eine feste Zahl von unbekannten Zellproben (Panel) unverwandter Personen getestet wurden. Er benutzte dazu den Leukozytenagglutinationstest (LAT) und verglich anschließend die positiven und negativen Reaktionen eines Serums mit den entsprechenden Reaktionen jedes anderen Serums, um gleich oder sehr ähnlich reagierende Seren aus der großen Fülle herauszufinden. Für den paarweisen Vergleich wurden die Reaktionen zweier Seren zunächst in eine Vierfeldertafel übertragen (Abb.11) und dann mit Hilfe des Chi^2-Tests geprüft, ob die gemeinsamen Reaktionen der beiden Seren (A und D in der Vierfeldertafel) nicht zufällig bedingt waren.

	Serum 1 +	Serum 1 −	
Serum 2 +	A	B	A+B
Serum 2 −	C	D	C+D
	A+C	B+D	N

A= Zellproben, die mit beiden Seren reagieren
B= Zellproben, die nur mit Serum 2 reagieren
C= Zellproben, die nur mit Serum 1 reagieren
D= Zellproben, die mit keinem der beiden Seren reagieren
N= Gesamtzahl getesteter Zellproben

Abb. 11 : Vierfeldertafel für den paarweisen Vergleich der Reaktionen zweier Seren

Bei Chi^2-Werten über 3,84 ist der Zufall für gemeinsame Reaktionen weitgehend ausgeschlossen und damit die Voraussetzung für eine nachfolgende Ähnlichkeitsbetrachtung erfüllt. Unter der Vorstellung, daß sich zwei Seren sehr ähnlich sind, wenn sie die gleiche Anzahl gemeinsam positiver und gemeinsam negativer Reaktionen haben, wurde ein Ähnlichkeitskoeffizient (S) formuliert (89)

$$S = \frac{A + D}{N} \times 100$$ (mit A, D und N aus der Vierfeldertafel),

der die Ähnlichkeit zweier Seren in Prozent aus-

drückt. Dieses sehr zeit - und arbeitsaufwendige Verfahren wurde durch den Einsatz von Computern wesentlich erleichtert.
Mit dieser Methode, die primär der Identifizierung von HLA-Antigenen dienen sollte, wurden Gruppen von gleich oder sehr ähnlich reagierenden Seren zusammengestellt und mit der Definition des korrespondierenden Antigens gleichzeitig die Spezifität dieser Seren bestimmt.
Bei den heute allgemein gebräuchlichen Verfahren zur Bestimmung der Spezifität von HLA-Antiseren handelt es sich wie bei der VAN ROOD'schen Methode um Vergleichsanalysen. Dabei erfolgt die Identifizierung des Serums entweder durch den Vergleich seiner Reaktionen mit vortypisierten Testzellen oder den Reaktionen von HLA-Antiseren bekannter Spezifität.

3.2 Vergleich der Reaktionen eines unbekannten Antiserums mit den Antigenen typisierter Testzellen (Referenz-Zellen)

Bei diesem Verfahren kann entweder mit einem festen Zellpanel oder mit den im Routinebetrieb typisierten Zellen gearbeitet werden.

3.2.1 Vortypisiertes Zellpanel

Ein Zellpanel ist charakterisiert durch:
a) eine relativ kleine Zahl von
b) hochselektierten Testzellen, die
c) von ständig verfügbaren Personen stammen und
d) mehrmals mit standardisierten HLA-Antiseren typisiert sind.

ad a) Die kleine Zahl von Testzellen (Lymphozytensuspensionen von etwa 20 Personen) erlaubt ein schnelles Ablesen der Reaktionen und eine leichte Identifizierung des untersuchten Serums. Allerdings gilt dies uneingeschränkt nur für monospezifische Antiseren, da für die Identifizierung duo - und oligospezifischer Seren eine größere Anzahl von Testzellen erforderlich ist (55). Dennoch bleibt das Reaktionsmuster überschaubar, so daß allein durch visuellen Vergleich eine Identifizierung des Serums möglich ist.

ad b) Nach BERTRAMS et al. (12) sollen die Zellen für ein Panel so zusammengestellt werden, daß
1) alle bekannten Antigene mindestens dreimal, optimal fünfmal, vertreten sind,
2) höchstens drei - bis fünfmal Spenderzellen mit gesättigten Loci, d.h. mit zwei Antigenen pro Locus, vorhanden sind,
3) mindestens fünfmal sog. "leere" Spenderzellen pro Locus, d.h. ohne eines der bekannten Antigene, zur Verfügung stehen.

ad c) Die Referenzzellen stammen in der Regel von Institutsmitgliedern oder anderen Personen (z.B. Blutspendern), die ständig verfügbar und zu häufigeren Blutspenden bereit sind. Ihnen wird in gewissen Abständen Blut zur Lymphozytenpräparation entnommen und die isolierten Lymphozyten entweder sofort verbraucht oder aber für kurze Zeit eingefroren.

ad d) Die Typisierung der Referenzzellen kann einem Speziallabor überlassen werden, das über

einen besonders großen Serumsatz verfügt oder durch wiederholte Bestimmung im eigenen Labor mit kommerziellen oder bereitgestellten Antiseren erfolgen.

3.2.2 Im Routinebetrieb typisierte Zellen

Neben dem festen Zellpanel können auch die in einem Routinelabor laufend typisierten Zellen zur Identifizierung von Antiseren verwendet werden. Allerdings ist bei diesem Verfahren eine wesentlich größere Anzahl von Testzellen notwendig (55), um auch die weniger häufigen HLA-Antigene mehrmals auf den Zellen zu haben. Die Auswertung von Reaktionen eines Serums mit einer großen Zahl von Zellen ist zwar aufwendig, kann aber durchaus mit manueller Datenverarbeitung auch ohne den Einsatz von Computern bewältigt werden. Diese Methode wird vor allem dann angewendet, wenn in einem neuen HLA-Labor noch kein ausreichend vortypisiertes Zellpanel vorhanden ist, und es nicht nur um die Gewinnung geeigneter HLA-Typisierungsseren geht, sondern z.B. auch die Häufigkeit und Spezifität schwacher bzw. kreuzreagierender Seren interessiert.

3.3 Vergleich der Reaktionen eines unbekannten Antiserums mit den Reaktionen von Antiseren bekannter Spezifität (Referenz-Seren)

Diese Methode, die sich ebenfalls zur Definition unbekannter HLA-Antiseren eignet, wird häufig den unter 3.2 beschriebenen Verfahren angeschlossen und dient

dann der Bestätigung bereits identifizierter Antikörperspezifitäten (55).
Die Reaktionen des zu definierenden Serums werden mit den Reaktionen der Referenzseren an einem Zellpanel Unverwandter verglichen. Seren mit ähnlichem Reaktionsmuster werden durch direkten Vergleich in der Vierfeldertafel zusammengefaßt und für jede Serumkombination wird Chi^2 und der Ähnlichkeitskoeffizient S errechnet. Um zusätzliche Antikörper zu einer bereits gefundenen Spezifität in einem Serum definieren zu können, werden jene Zellen, mit denen das untersuchte Serum abweichende Reaktionen gegenüber dem Standardserum gibt, graphisch zusammengefaßt und dahingehend untersucht, ob alle diese Zellen ein gemeinsames Antigen besitzen.

3.4 Weitere Methoden

Neben den Vergleichsanalysen besteht auch die Möglichkeit, durch Absorption und Familienuntersuchungen die Spezifität eines Antiserums zu bestimmen. Bei den Absorptionsverfahren sind die Kreuzreaktionen besonders zu berücksichtigen.
Beide Methoden sind sehr aufwendig und dienen nur zur weiteren Charakterisierung, wenn mit den oben beschriebenen Verfahren ein gutes, für die HLA-Typisierung geeignetes Serum gefunden wurde.

4 EIGENE UNTERSUCHUNG

4.1 Material

4.1.1 Seren von weiblichen Blutspendern

Eine Gesamtzahl von 1150 Seren weiblicher Blutspender, die in der Zeit vom 7.6.1978 - 21.2.1979 in der Blutbank des Instituts für Gerinnungswesen und Transfusionsmedizin der Universität Düsseldorf (Direktor Prof. Dr. H. Brüster) Blut gespendet hatten, wurden auf zytotoxische HLA-Antikörper hin untersucht.
Da es bei den Blutspenderinnen um die Frage der Durchseuchung mit HLA-Antikörpern ging und eine genaue Schwangerschaftsanamnese (Aborte) oftmals nicht zu erhalten war, wurden alle weiblichen Blutspender, d.h. auch Nulliparae, in die Untersuchung einbezogen.

4.1.2 Schwangerenseren

Untersucht wurden Serumproben von insgesamt 305 schwangeren Frauen, die in der Zeit vom 29.6.1978 - 2.3.1979 zur Schwangerenvorsorge in die Ambulanz der Universitäts-Frauenklinik Düsseldorf (Direktor Prof. Dr. L. Beck) gekommen waren. Bei allen Frauen wurde eine genaue Schwangerschafts - und Transfusionsanamnese erhoben.
Von den 305 Schwangeren waren 134 (43,9%) Primiparae und 171 (56,1%) Multiparae.
Die Schwangerschaftsdauer zum Zeitpunkt der Blutabnahme gibt Tabelle 3 wieder.

	1.Trimenon	2.Trimenon	3.Trimenon	post partum
Primiparae N=134	19 (6,2%)	35 (11,5%)	68 (22,3%)	12 (3,9%)
Multiparae N=171	17 (5,6%)	35 (11,5%)	101(33,1%)	18 (5,9%)
Gesamt N=305	36 (11,8%)	70 (23,0%)	169(55,4%)	30 (9,8%)

Tab. 3 : Angaben über die Dauer der Schwangerschaft zum Zeitpunkt der Blutabnahme bei primi-und multiparen Frauen

4.1.3 Testzellen

Als Testzellen dienten Zellen, die mit kommerziellen Seren (Firmen: Behring, Biotest, Fresenius, Mérieux) bzw. mit vom NIH bezogenen Referenzseren typisiert worden waren. Zur Typisierung wurden mindestens 120 mono-und oligospezifische Antiseren eingesetzt. Alle in der WHO-Nomenklatur von 1977 aufgeführten HLA-Antigene von Kaukasiern konnten bestimmt werden, mit Ausnahme der Spezifitäten HLA-Bw41, Bw46, Bw47, Bw48 und HLA-Cw6, für die zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Testseren zur Verfügung standen. Bei der Typisierung war jede Spezifität mindestens viermal auf den Testplatten vorhanden.

4.2 Methoden

Die in dieser Untersuchung angewandte Methode zur HLA-Antikörpersuche - und Identifizierung umfaßte im Wesentlichen zwei Schritte:

1. Typisierung der Testlymphozyten mit kommerziellen und NIH-Seren
2. Suche und Identifizierung antikörperhaltiger Seren mit den vortypisierten Zellen.

Dabei wurde sowohl zur HLA-Typisierung als auch zur Antikörpersuche der Mikrolymphozytotoxizitätstest (LCT) angewandt. Diese 1964 von TERASAKI und MC CLELLAND (102)entwickelte Mikromethode wurde vom amerikanischen "National Institute of Health" als Standardmethode anerkannt und wird deshalb auch als "NIH-Technik" bezeichnet.

Das Prinzip dieses Tests beruht darauf, daß HLA -Antigene auf der Lymphozytenmembran nach Inkubation mit den korrespondierenden Antikörpern unter Komplementverbrauch reagieren. Als Folge der Antigen-Antikörper-Reaktion verliert die Zellmembran ihre physiologische Schrankenfunktion, so daß geschädigte Zellen einen anschließend zugesetzten Farbstoff (z.B. Eosin) aufnehmen, während die intakten, vitalen Zellen vor Anfärbung geschützt sind.

4.2.1 Serumgewinnung

10 ml frisch entnommenes Nativblut wurde nach Ablauf der Spontangerinnung 10 Minuten bei 1000 g zentrifugiert und das überstehende Serum vorsichtig in ein sauberes, beschriftetes Röhrchen abpipettiert. Aus jedem Serumröhrchen wurden ca. 200 µl in ein beschriftetes Beckmannröhrchen (Fa. Greiner) übertragen, um bei der Weiterverarbeitung der Seren wiederholtes Einfrieren und Auftauen einer größeren Serummenge und damit verbundene Aktivitätsverluste zu vermeiden.
Alle Seren wurden bei einer Temperatur von -80° C gelagert.

4.2.2 Vorbereitung der Testplatten

Zur Durchführung des Mikrolymphozytotoxizitätstests wurden Mikrotestplatten (Terasaki-Tray, Fa. Greiner) mit 6 x 10 Vertiefungen verwendet.

In jede Vertiefung wurde zunächst mittels automatischem Öler (oil dispenser, Fa. Greiner) ca. 5 µl Paraffinöl (Paraffin dickflüssig, Nr. 7160, Fa. Merck) eingetropft. Dieses weder antikomplementär wirkende noch zytotoxisch reagierende Öl schafft einen luftdichten Abschluß für das später einzubringende Serum und verhindert dadurch eine mögliche Verdunstung.

4.2.3 Beschickung der Testplatten mit Serum

Das Einbringen der Seren in die vorgeölten Testplatten erfolgte maschinell mit dem Seromat (Fa. Greiner). Dazu wurden entsprechend den 60 kleinen Reaktionsgefäßen der Mikrotestplatten von 60 der zu untersuchenden Seren die gesondert abgefüllte Menge von je 200 µl aufgetaut, die Position jedes Serums auf der Platte festgelegt und genau dokumentiert. Anschließend wurden gemäß der Anzahl der zu fertigenden Testplatten von jedem Serum 50-100 µl in die Füllplatte des Seromaten pipettiert.
Nach dreimaligem Waschen des Seromaten mit Aqua bidest. und doppeltem Spülen mit steriler isotoner NaCl-Lösung wurden die 60 Seren aus der Füllplatte in den Seromat aufgezogen. Danach wurden die vorgeölten Testplatten in den Seromat geführt und gleichzeitig von allen 60 Seren je 1 µl in die vorgesehenen Vertiefungen unter das Paraffinöl gespritzt. In dieser Weise wurden jeweils 50-100 Testplatten mit gleicher Serumzusammenstellung vorbereitet, beschriftet und bis zur Zugabe

der Testzellen bei -80° C eingefroren.
Die vom HLA-Labor zur Zelltypisiereng eingesetzten Serumplatten wurden in ähnlicher Weise vorbereitet bzw. mit den HLA-Typisierungsseren beschickt.

4.2.4 Herstellung der Lymphozytensuspension

Die Testlymphozyten wurden nach einem 1968 von BØYUM (15) beschriebenen Verfahren in folgender Weise aus dem Probandenblut isoliert:
In einem doppelten Ansatz werden je 2 ml heparinisiertes Venenblut mit je 4 ml isotoner NaCl-Lösung verdünnt und anschließend auf einen Dichtegradienten (3 ml Lymphoprep D=1,077 g/ml, Fa. Nyegaard&Co, Norwegen) überschichtet.
Die beiden so vorbereiteten Ansätze werden anschließend für 10 Minuten bei 1000 g zentrifugiert. Lymphozyten und Thrombozyten sind danach durch den Dichtegradienten von den Erythrozyten getrennt und befinden sich in einem Zellring zwischen Serum und Dichtegradient. Mit einer Pasteurpipette werden sie vorsichtig abgehoben und in ein graduiertes Spitzröhrchen gegeben. Zweimaliges Waschen mit Hank'scher Lösung (Hanks Solution Nr.811070, Fa. Biotest, Frankfurt a. M.) durch Zentrifugation bei 380 g für 10 Minuten entfernt die ebenfalls HLA-Antigen tragenden Thrombozyten.

Nach dem ersten Waschen werden die Lymphozyten in der Zählkammer (Neubauer) gezählt, auf ihre Vitalität geprüft und mit Hank'scher Lösung auf 2000 Zellen/µl eingestellt.
Zeigen sich bei der Zählung größere Mengen Erythrozyten, werden diese mittels osmotischer Behandlung

durch Zugabe von Aqua dest. in gleicher Menge für 30 Sekunden beseitigt.

4.2.5 Durchführung des Lymphozytotoxizitätstests

Mit der Lymphozytensuspension wurden sowohl die HLA-Typisierungsplatten als auch die Mikrotestplatten in folgender Weise beschickt:
In die Platten wird nach dem Auftauen pro Vertiefung 1 µl Zellsuspension eingespritzt und 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser ersten Inkubation wird Kaninchenkomplement (Fa. Behring Lot. Nr.3025 A) im Überschuß (je 5 µl pro Vertiefung) zugesetzt und für weitere 60 Minuten inkubiert. Anschließend wird jeweils 5 µl wässeriges Eosin (Eosin wässerig 5%) zugegeben, das zur Entfernung von Kristallen vorher sorgfältig gefiltert wurde. Innerhalb von drei Minuten werden alle lysierten Zellen vom Eosin rot angefärbt.
Mit je 5 µl einer 35%igen Formalinlösung (Fa.Merck, Nr.4003), deren pH-Wert mit 0,1N Natronlauge (Fa. Merck, Nr.7160) auf 7,4 eingestellt wurde, wird der Test fixiert und die Platte anschließend mit einem Objektträger abgedeckt.
Nach einer Wartezeit von etwa einer Stunde, während der sich die aufgewirbelten Zellen auf den Boden der kleinen Reaktionsgefäße absetzen können, werden die Reaktionen im umgekehrten Phasenkontrastmikroskop (Invertoskop D, Fa. Zeiss) abgelesen und nach folgendem Schema bewertet:

\- = 0- 10% lysierte Zellen
\+ = 10- 20% lysierte Zellen
++ = 20- 50% lysierte Zellen
+++ = 50- 70% lysierte Zellen
++++ = 75-100% lysierte Zellen

4.2.6 Durchführung der Untersuchung

Von den 50 mit gleichen Seren versehenen Mikrotestplatten wurden zunächst 45 mit den im Routinelabor typisierten Zellen beschickt und anschließend überprüft, ob den 60 Seren alle vom Labor typisierbaren HLA-Antigene ausreichend häufig angeboten worden waren. Noch fehlende bzw. selten vorkommende Antigene wurden auf den verbliebenen 5 Testplatten mit eingefrorenen Testzellen, die die entsprechenden Antigene trugen, nachgetestet.
Da 1455 Seren zu untersuchen waren, wurde dieses Testprogramm insgesamt 25 mal mit jeweils 50 Mikrotestplatten durchgeführt.
Jede Reaktion eines Serums wurde mit Angabe ihrer Stärke auf einem Ablochschema für Daten (Fa. IBM) genau dokumentiert. Anschließend wurden alle Seren, die mit den angebotenen Testzellen Reaktionen gezeigt hatten, zur weiteren Identifizierung auf neuen Mikrotestplatten zusammengestellt (Positiven-Platten) von denen jeweils 100 Stück angefertigt und mit der oben beschriebenen Methodik getestet wurden. Nach Auswertung dieser "P-Platten" wurden alle reaktionsstarken Seren auf weiteren P-Platten ausgetestet. Diejenigen Seren, die den an ein HLA-Typisierungsserum gestellten Qualitätsanforderungen (4.3.2) genügten, bzw. sich für einen laborinternen Serumsatz eigneten, wurden als begleitende Typisierungsseren eingesetzt.

4.3 Statistische Auswertung

4.3.1 Chi^2-Test, restriktive Analyse

Alle Zellen, mit denen ein Serum reagiert hatte, wurden zusammengefaßt und dahingehend untersucht, ob diese Zellen ein gemeinsames HLA-Antigen besaßen, auf das die Reaktionen zurückgeführt werden konnten. Die daraus abgeleitete Vermutung über einen bestimmten Antikörper im Serum wurde anschließend mit Hilfe des Chi^2-Tests (mit Diskontinuitätskorrektur nach Yates) in der von SELWOOD 1969 (89) und ARMITAGE 1971 (9) angegebenen Weise geprüft. Dabei wurden die diskrepanten Reaktionen dem Serum als "falsch" positive (=Extra-Reaktionen) bzw. "falsch" negative Reaktionen (=Ausfälle) angelastet, die positiven und negativen Reaktionen sowie die Anzahl der Zellen gegen die dieses Serum getestet worden war, in eine Vierfeldertafel übertragen und mit der angegebenen Formel der Chi^2-Wert bzw. der nach Yates korrigierte Chi^2-Wert berechnet (Abb. 12).

		Zellen: Antigen positiv	Zellen: Antigen negativ	
Serum	Reaktion positiv	a	b	n_1
	Reaktion negativ	c	d	n_2
		a+c	b+d	n

$$\chi^2 = \frac{(ad - bc)^2 \cdot n}{(a+c)(b+d)\, n_1\, n_2}$$

$$\chi^2_{Yates} = \frac{\left(|ad - bc| - \frac{n}{2}\right)^2 \cdot n}{(a+c)(b+d)\, n_1\, n_2}$$

Abb. 12 : Vierfeldertafel für den $Chi^2(\chi^2)$-Test

Nach den Bedingungen des Chi²-Tests für Vierfeldertafeln enthält ein Serum erst dann einen bestimmten HLA-Antikörper, wenn die Zufallswahrscheinlichkeit für die beobachteten Reaktionen kleiner ist als 0,05. Dies ist bei allen Chi²-Werten über 3,84 erreicht, da für ein Signifikanzniveau von 0,05 der Chi²-Wert 3,84 beträgt (77).
Um ein Serum nach weiteren HLA-Antikörpern zu untersuchen wurde anschließend eine restriktive Analyse (14) durchgeführt. Dazu wurden alle Zellen mit einem Antigen, für das bereits vorher ein entsprechender Antikörper gefunden worden war und mit denen das Serum auch reagiert hatte, bei der folgenden Berechnung ausgeschlossen. Das heißt, diese Zellen wurden nicht wieder in der Vierfeldertafel aufgeführt, wenn das Serum nach einem weiteren HLA-Antikörper mit dem Chi²-Test untersucht wurde.
Diesem HLA-Antikörper wurden dadurch keine unnötig "falsch" positiven Reaktionen angelastet.

4.3.2 Qualitätsprüfung von HLA-Antiseren

Die Qualität von HLA-Antiseren wird durch zwei Merkmale charakterisiert:
1. die Spezifität
2. die Reaktionsstärke
Die Spezifität wurde, wie unter Punkt 4.3.1 beschrieben, durch den Vergleich der Reaktionen eines Serums mit den Antigenen der mit dem Serum getesteten Zellen in der Vierfeldertafel identifiziert, die Reaktionsstärke durch die Anzahl der Reaktionen verschiedener Stärkegrade dokumentiert.

Dabei wurden alle mit dem Chi^2-Test bzw. dem korrigierten Chi^2-Wert nach Yates signifikanten Antigene in die Spezifitätenangabe eines Serums aufgenommen und anschließend die einzelnen Seren festgelegten Qualitätsklassen zugeordnet.

I. Der ersten Klasse wurden diejenigen Seren zugeordnet, die den auf dem Histokompatibilitäts-Workshop 1976 in Bethesda (66) gestellten Qualitätsanforderungen an ein HLA-Typisierungsserum genügen. Danach beträgt die Höchstgrenze zulässiger "falsch" positiver Reaktionen (=Reaktionen mit Zellen, denen das korrespondierende Antigen fehlt) 3% und maximal 14% "falsch" negativer Reaktionen (=Ausbleiben der Reaktionen mit Zellen, die das korrespondierende Antigen tragen) dürfen vorkommen. Von der Reaktionsstärke wird gefordert, daß mindestens 70% der reagierenden Zellpopulationen, die das korrespondierende Antigen tragen (=spezifisch positive Reaktionen), eine Reaktionsstärke von über 75% lysierter Zellen aufweisen. Bei duo - bzw. trispezifischen Antiseren soll jede Spezifität den gleichen Anforderungen genügen, wie die eines monospezifischen Serums.

II. Der zweiten Klasse wurden alle die Seren zugeordnet, die zwar die strengen Qualitätsanforderungen an ein Typisierungsserum nicht erfüllen, die aber dennoch in einen begleitenden Serumsatz aufgenommen werden können. Sie dürfen maximal 6% "falsch" positive und 28% "falsch" negative Reaktionen zeigen. 70% der spezifisch positiven Reaktionen müssen eine Stärke von drei und vier haben.

Bei Seren mit mehr als einem HLA-Antikörper soll jede enthaltene Spezifität diesen Anforderungen genügen.

Die "falsch" positiven Reaktionen sowohl der ersten als auch der zweiten Klasse dürfen nur schwach sein, d.h. nur Stärken von eins und zwei zeigen.

III. Die dritte Klasse enthält Seren, die einen hohen Prozentsatz "falsch" positiver oder "falsch" negativer Reaktionen haben, unabhängig von der Stärke der Reaktionen.

IV. In der vierten Klasse finden sich multispezifische Seren, d.h. Seren, die mit mehr als 90% der angebotenen Zellen reagieren (29) und Seren, deren Reaktionen keiner HLA-Spezifität zugeordnet werden kann.

5 ERGEBNISSE

5.1 Seren weiblicher Blutspender

Von den 1150 auf zytotoxische HLA-Antikörper hin untersuchten Seren weiblicher Blutspender zeigten insgesamt 55 (4,8%) positive Reaktionen mit den im Lymphozytotoxizitätstest angebotenen Zellen.

Die statistische Auswertung dieser 55 Seren mit Hilfe des Chi^2-Tests ergab in 28 Seren nur eine nachweisbare HLA-Spezifität. In 9 Seren waren zwei und in 3 Seren drei oder vier Antikörper festzustellen. Zytotoxische Reaktionen, die keiner HLA-Spezifität zugeordnet werden konnten, zeigten 15 Seren. Kein Blutspenderinnenserum war multispezifisch (Tab. 4).

Zehn der 40 Seren mit definierbarer Spezifität enthielten Antikörper gegen Antigene des Locus A, in 28 Seren waren die Antikörper gegen B-Locus-Antigene gerichtet. In zwei Seren waren sowohl Antikörper gegen Antigene des Locus A als auch des Locus B nachzuweisen. Gegen HLA-C-Antigene gerichtete Antikörper waren in keinem Serum zu finden (Tab. 5).

Die Zuordnung eines Serums zu einer der in Tabelle 4 aufgeführten Gruppen erfolgte, wie bereits erwähnt, ungeachtet seiner Qualität nur danach, ob und wieviele Spezifitäten mit dem Chi^2-Test nachzuweisen waren.

Die anschließend durchgeführte Qualitätsprüfung der

40 identifizierten Seren anhand der in Abschnitt 4.3.2 beschriebenen Kriterien ergab, daß:

4 Seren den an ein HLA-Typisierungsserum gestellten Qualitätsanforderungen genügen (Klasse I)
6 Seren in die Klasse II eingeordnet werden können
30 Seren eine ungenügende Qualität aufweisen (Klasse III)

Auf die Gesamtzahl der 1150 untersuchten Seren weiblicher Blutspender bedeutet das eine Ausbeute von:

0,3% Seren der Klasse I
0,5% Seren der Klasse II
2,6% Seren der Klasse III

Die in den Seren enthaltenen Antikörperspezifitäten finden sich in Tabelle 6.
Da es bei der Untersuchung der Seren weiblicher Blutspender primär nicht um die Gewinnung von HLA-Testseren, sondern um die Feststellung der Häufigkeit und Stärke von HLA-Antiseren ging, wurden alle Seren ungeachtet ihrer Qualität noch einmal nach dem Prozentsatz starker Reaktionen bewertet. Als stark gelten alle Reaktionen mit einer Stärke von drei oder vier. Die Gruppeneinteilung erfolgte willkürlich. Tabelle 7 gibt das Ergebnis wieder.

5.2 Schwangerenseren

Von den 305 untersuchten Seren schwangerer Frauen reagierten insgesamt 40 (13,1%) im Lymphozytotoxizitätstest.
Die statistische Auswertung ergab in 16 Seren eine, in 3 Seren zwei und in 5 Seren drei oder vier nachweisbare Spezifitäten. Sieben Seren konnten aufgrund ihrer Multispezifität nicht näher definiert werden, in 9 Fällen ließen sich die zytotoxischen Reaktionen keinem bekannten HLA-Antigen zuordnen (Tab. 8).
Von den 24 Seren mit definierbarer Spezifität enthielten 3 Antikörper gegen Antigene des ersten Locus (HLA-A), 20 Antikörper gegen Antigene des zweiten Locus (HLA-B), und nur in einem Serum war der Antikörper gegen ein Antigen des dritten Locus (HLA-C) gerichtet. Antikörper gegen HLA-Antigene verschiedener Loci wurden in keinem Serum gefunden (Tab. 5).
Die Qualitätsprüfung der 24 Seren mit nachweisbarer Spezifität zeigte, daß:

5 Seren die Qualitätsanforderungen der Klasse I erfüllen
6 Seren der Klasse II zugeordnet werden können
13 Seren eine ungenügende Qualität aufweisen und somit in die Klasse III gehören

Bezogen auf die 305 untersuchten Schwangerenseren bedeutet das eine Ausbeute von:

1,6% Seren der Klasse I
2,0% Seren der Klasse II
4,3% Seren der Klasse III

Die in den Seren enthaltenen Antikörperspezifitäten gibt die Tabelle 9 wieder.
Eine weitere Aufschlüsselung nach der Häufigkeit zytotoxischer Seren in Abhängigkeit von der Kinderzahl war bei einem Untersuchungsgut von 21 Seren nicht möglich. Die durchschnittliche Kinderzahl bei den Multiparae betrug 1,5.
Bei den primiparen Frauen ist das Verhältnis der Seren mit einer Einzelspezifität zu denen mit mehreren nachweisbaren Spezifitäten etwa gleich. D.h. von den insgesamt 12 zytotoxisch reagierenden Seren primiparer Frauen enthalten 6 Seren nur eine, die anderen 6 Seren mehrere nachweisbare Spezifitäten. Dagegen ist das Verhältnis Einzelspezifität zu Mehrfachspezifität bei multiparen Frauen zugunsten der Seren mit Mehrfachspezifitäten verschoben. Von den 28 antikörperhaltigen Seren der Multiparae war in 10 Seren eine Einzelspezifität und in 18 Seren Mehrfachspezifitäten nachzuweisen (Tab. 10).
Die Zuordnung zu den Qualitätsklassen zeigt allerdings, daß, obwohl die Ausbeute an HLA antikörperhaltigen Seren bei den Multiparae mit 16,4% gegenüber den 9% der Primiparae größer ist, der Prozentsatz der qualitativ guten Seren der Klasse I mit 1,8% nur geringfügig höher liegt als bei den Primiparae mit 1,5% (Tab. 10).

HLA-Antiseren	Anzahl der Seren	%
eine Spezifität nachweisbar	28	2,4
zwei Spezifitäten nachweisb.	9	0,8
drei-vier Spez. nachweisbar	3	0,3
multispezifisch	0	0
Spez. nicht identifizierbar	15	1,3
Summe	55	4,8

Tab. 4 : Ergebnis der HLA-Antikörpersuche in 1150 Seren weiblicher Blutspender

HLA-Antiseren definierter Spezifität	Antikörper gegen			
	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-A/B
von Schwangeren N=24	3 12,5%	20 83,3%	1 4,2%	0
von Blutspenderinnen N=40	10 25%	28 70%	0	2 5%

Tab. 5 : Häufigkeit von HLA-Antikörpern gegen Antigene jeweils eines Locus bzw. gegen Antigene verschiedener Loci in Seren von Schwangeren und Blutspenderinnen

Anzahl der Seren	HLA-Antikörperspezifitäten	Qualitäts klasse
1	A 2	I
1	B 5	
2	B 8	
3	A 2	II
1	A 2, A 11	
1	A 9, A 12	
1	B 40	
2	A 2	III
1	A 10	
1	Aw19	
1	A 2, A 11	
1	A 2, B 12	
6	B 8	
1	B 12	
1	B 13	
1	B 14	
3	B 15	
1	B 17	
2	B 27	
1	B 40	
1	B 13, B 17	
1	B 17, Bw22	
1	B 5, B 15	
2	B 5, Bw35	
1	B 5, Bw35, B 17	
1	B 7, B 40, B 8	
1	B 7, Bw22, B 40, B 27	

Tab. 6 : HLA-Antikörperspezifitäten in Seren weiblicher Blutspender mit Zuordnung zu den Qualitätsklassen I, II und III

Gruppe	Blutspenderinnenseren	
	Anzahl	%
A Anteil starker Reaktionen ≤25%	14	25,5
B Anteil starker Reaktionen >25 ≤ 50%	15	27,3
C Anteil starker Reaktionen >50 ≤ 75%	13	23,6
D Anteil starker Reaktionen >75 ≤ 100%	13	23,6

Tab. 7 : Zytotoxisch reagierende Seren weiblicher Blutspender (N=55).
Einteilung nach der Häufigkeit starker Reaktionen mit den Testzellen

HLA-Antiseren	Anzahl der Seren	%
eine Spezifität nachweisbar	16	5,2
zwei Spezifitäten nachweisb.	3	1,0
drei-vier Spez. nachweisbar	5	1,6
multispezifisch	7	2,3
Spez. nicht identifizierbar	9	3,0
Summe	40	13,1

Tab. 8 : Ergebnis der HLA-Antikörpersuche in 305 Schwangerenseren

Serum-Nr.	HLA-Antikörperspezifitäten	Qualitäts klasse
110	B 12	I
231	B 13	
247	B 8	
184	Cw 4	
302	B 8, B 14	
186	A 2	II
126	B 12, Bw 21	
181	B 5, Bw 35, B 18	
199	B 15, B 13, B 40	
81	B 7, Bw 22, B 27	
147	B 7, Bw 22, B 13, B 40	
84	A 10	III
254	Aw19	
171	B 8	
251	B 8	
261	B 12	
267	B 12	
66	B 13	
235	B 13	
244	B 14	
185	Bw21	
286	B 40	
27	B 5, Bw 35	
197	B 5, Bw 35, B 15	

Tab. 9 : HLA-Antikörperspezifitäten in Schwangerenseren mit Zuordnung zu den Qualitätsklassen I, II und III

Schwangerenseren	zytotoxisch reagierend	Einzelspezifitäten	Mehrfachspezifitäten	Qualitätsklassen			
				I	II	III	IV
Primiparae	12	6	6	2	1	5	4
N=134							
100%	9%	4,5%	4,5%	1,5%	0,8%	3,7%	3%
Multiparae	28	10	18	3	5	8	12
N=171							
100%	16,4%	5,9%	10,5%	1,8%	2,9%	4,7%	7,0%

Tab. 10 : Zytotoxisch reagierende Seren primi-und multiparer Frauen

6. DISKUSSION DER ERGEBNISSE UND VERGLEICH ZUR LITERATUR

Von den 305 untersuchten Seren schwangerer Frauen enthielten 40 Seren (=13,1%) zytotoxische Antikörper. Dieses Ergebnis stimmt mit dem anderer Autoren überein (109,91), die ebenfalls primi-und multipare Frauen untersucht und die Blutproben zu verschiedenen Zeitpunkten der Schwangerschaft abgenommen hatten. Nur mit diesen Studien ist ein Vergleich möglich, da die Frequenz, mit der HLA-Antikörper gefunden werden,sowohl von der Schwangerschaftsdauer, als auch von der Anzahl vorausgegangener Schwangerschaften abhängt (109,1,30). Mit der Zahl der Schwangerschaften steigt die Häufigkeit von HLA-Antikörpern. Beim Vergleich der Primiparae mit den Multiparae (durchschnittliche Kinderzahl 1,5) war ein Unterschied von 9% zu 16,4% an zytotoxisch reagierenden Seren festzustellen.

Bezüglich der Qualität der Antiseren bestätigt die eigene Untersuchung die Arbeiten von TONGIO et al.(104,106),wonach sowohl von primi-als auch multiparen Frauen gute Testseren gewonnen werden können. Von den fünf Seren, die den Qualitätsanforderungen an HLA-Typisierungsseren entsprechen, stammen zwei von Erstschwangeren.

Daß die Antikörperhäufigkeiten nicht dem Erwartungswert entsprechen, der bei Erstschwangeren der Allelfrequenz und nach sehr vielen Schwangerschaften etwa der Phänfrequenz entspricht (92), ist möglicherweise auf die unterschiedliche Immunogenität einzelner antigener Merkmale, aber auch auf Einflüsse des Kopplungsungleichgewichts und der Bildung kreuzreagierender Antikörper, zurückzuführen (92,51,108).

Wieviel mal häufiger bzw. seltener man mit dem Auftreten eines bestimmten Antikörpers gegenüber dem Erwartungswert zu rechnen hat, zeigt eine Untersuchung zur Immunogenität von HLA-Antigenen von TOVEY et al.(108). In Übereinstimmung mit dem Ergebnis dieser Studie, wonach Schwangere wesentlich häufiger durch Antigene des Locus B sensibilisiert werden, enthalten auch die Antiseren der eigenen Untersuchung zum größten Teil (83,3%) Antikörper, die gegen Genprodukte des HLA-Locus B gerichtet sind. Ebenso finden sich in keinem Serum Antikörper gegen Antigene verschiedener Loci (51).
Kreuzreagierende Antikörper, die die Frequenz bestimmter HLA-Antikörper über deren Erwartungswert hinaus erhöhen, sind in Schwangerenseren häufig zu finden. Von den 24 Seren dieser Untersuchung mit identifizierter Spezifität enthalten 5 (20,8%) mehr als zwei Antikörperspezifitäten gegen Antigene eines HLA-Locus. Eine solche Konstellation ist nur möglich, wenn die Frauen durch vorhergegangene Transfusionen bereits gegen HLA-Antigene sensibilisiert worden sind, oder aber bei Multiparae die Kinder nicht den selben Vater haben. Anderenfalls müssen kreuzreagierende HLA-Antikörper angenommen werden. Drei dieser Seren stammen von multiparen (Serum Nr. 81, 181, 199), zwei von primiparen Frauen (Serum Nr. 147, 197). Die Wahrscheinlichkeit, daß es sich in den Seren der Multiparae um kreuzreagierende Antikörper handelt, ist relativ groß, da die Transfusionsanamnese bei allen Frauen negativ war. Bestätigt werden kann die Vermutung aber erst durch Absorptionsuntersuchungen bzw. durch die HLA-Typisierung des Ehemannes und den Ausschluß eines anderen Mannes als Vater. Bei den Primiparae können dagegen mit Sicherheit kreuzreagierende

Antikörper angenommen werden, da in der Anamnese dieser Frauen weder Transfusionen noch Aborte zu erfragen waren. Vier der Seren (Nr. 81, 147, 181, 197) enthalten typische, häufig vorkommende Antikörperkombinationen, die wahrscheinlich auf die Sensibilisierung durch nur ein Antigen zurückzuführen sind. Das Serum Nr. 199 enthält dagegen mit den Spezifitäten Anti-B15, B13, B40 eine ungewöhnliche Kombination. Da zwischen HLA-B13 und HLA-B40 Kreuzreaktionen besonders ausgeprägt sind (65, 5), zwischen HLA-B13/B40 und HLA-B15 dagegen nicht, scheint hier eine Sensibilisierung gegen zwei Antigene (B15/B40 oder B15/B13) vorzuliegen. Eine solche Sensibilisierung durch mehrere inkompatible Antigene und zusätzliche Bildung kreuzreagierender Antikörper mindert die Qualität der Schwangerenseren im allgemeinen noch mehr, als es dies durch kreuzreagierende Antikörper allein schon der Fall ist.

Die Beobachtung,daß zytotoxische HLA-Antikörper schon während der ersten Schwangerschaft gebildet werden können, hat die Frage nach dem Einfluß dieser mütterlichen Antikörper auf die bestehende bzw. folgende Schwangerschaft aufgeworfen.

Da der Fetus als ein natürliches, wenn auch zeitlich begrenztes, Allotransplantat mit einem HLA-kompatiblen und einem in der Regel HLA-inkompatiblen Haplotypen verstanden werden kann (98), und die zytotoxischen HLA-Antikörper der Mutter gewöhnlich zu den plazentagängigen IgG-Antikörpern gehören (2), wären an sich Abstoßungsreaktionen und entsprechende Schäden am Feten zu erwarten. Bislang konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Frequenz von Aborten, Totgeburten, neonatalen Neutropenien, Entwicklungsanomalien und HLA-Antikörpern festgestellt

werden (1,49,76).
Untersuchungen von DOUGHTY und GELSTHORPE (30,31), sowie von TONGIO und MAYER (107), deuten darauf hin, daß die Plazenta, die sehr reich an HLA-Antigenen ist (42b), offenbar eine Schrankenfunktion für HLA-Antikörper, die gegen HLA-Antigene des Feten gerichtet sind, ausübt. Bei Feten, die das zum mütterlichen Antikörper korrespondierende HLA-Antigen besaßen, ließen sich keine Antikörper im Nabelvenenblut, dafür aber im Plazentaeluat nachweisen. Umgekehrt fanden sich die HLA-Antikörper im Nabelvenenblut und nicht im Plazentaeluat, wenn den Feten das korrespondierende Antigen fehlte, der mütterliche Antikörper also durch Transfusionen oder vorangegangene Schwangerschaften anderer Inkompatibilität bedingt worden war (30,31,107).

Während die HLA-Antikörper beim Feten keine nachweislichen Schäden hervorrufen, können sie für die Mutter klinische Bedeutung bekommen und zwar dann, wenn bei ihr eine Bluttransfusion notwendig werden sollte. Durch die natürliche Sensibilisierung während der Schwangerschaft bedingt, kann es bereits bei der ersten Blutübertragung zu einer febrilen Transfusionsreaktion kommen, wenn die Frau HLA-Antikörper gebildet hat,und die Spenderzellen das korrespondierende Antigen tragen.
Besonders bei Multiparae, die kurze Zeit nach der letzten Schwangerschaft eine Bluttransfusion erhalten, muß mit der Möglichkeit einer solchen Transfusionsreaktion gerechnet werden. Aber auch bei Primiparae und Frauen, deren Entbindung längere Zeit zurückliegt, ist daran zu denken, zumal HLA-Antikörper

mitunter noch Jahre nach der Schwangerschaft nachzuweisen sind, wie eine Studie von TONGIO et al. (105) gezeigt hat.
Andererseits lassen Untersuchungen von AHRONS und KISSMEYER-NIELSEN (3,4) die Vermutung zu, daß auch die Übertragung von HLA-antikörperhaltigem Serum zu febrilen Transfusionsreaktionen führen kann.

Sie beschrieben den Fall eines Patienten, dem nach der Entfernung eines Nierentumors Bluttransfusionen gegeben werden mußten. Auf die dritte Transfusion reagierte er heftig mit Schüttelfrost und hohem Fieber, bei den folgenden vierzehn Übertragungen zeigte er aber keinerlei weitere Reaktionen. Alle serologischen Untersuchungen zur Klärung der Ursache blieben ergebnislos. Leukozytenantikörper waren beim Patienten nicht nachzuweisen. Das Serum des Spenders, dessen Blut die Transfusionsreaktion beim Patienten ausgelöst hatte, enthielt allerdings leukozytenagglutinierende und lymphozytotoxische Antikörper, die spezifisch gegen das Antigen HLA-A1 gerichtet waren. Die Typisierung des Empfängers ergab, daß er HLA-A1 positiv war.
AHRONS und KISSMEYER-NIELSEN folgerten daraus, daß in diesem speziellen Fall ein spezifischer, gegen ein HLA -Antigen gerichteter Antikörper im Spenderserum Ursache der Transfusionsreaktion gewesen war. Bei dem Spender handelte es sich um eine Frau, die selbst nie Transfusionen bekommen, aber zwei Schwangerschaften gehabt hatte. Diese lagen zehn bzw. sechs Jahre zurück.
Untersuchungen über die Häufigkeit von febrilen Transfusionsreaktionen, hervorgerufen durch HLA-Antikörper im Spenderserum, liegen zur Zeit nicht vor. Nach Meinung von AHRONS und KISSMEYER-NIELSEN sind sie eher selten als Ursache febriler Transfusionszwischenfälle anzunehmen.

Um einen Aufschluß über die Häufigkeit von HLA-Antikörpern in den Seren der Blutspender des Instituts für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin zu bekommen, wurden die Seren der weiblichen Blutspender auf diese Antikörper untersucht. Ein Screening der Seren männlicher Blutspender erübrigte sich, da sie keiner natürlichen Sensibilisierung unterliegen, und die Frequenz der durch Transfusionen oder evtl. sogar durch Transplantationen hervorgerufenen Antikörper als minimal anzusehen ist.
Da eine Blutspende alle zwölf Wochen erfolgen darf, ist anzunehmen, daß in dem Untersuchungszeitraum von 37 Wochen alle Frauen etwa gleich häufig Blut gespendet haben.
Nur in 55 der 1150 untersuchten Seren (4,8%) waren zytotoxische Antikörper nachzuweisen. Dieser geringe Prozentsatz macht die im Spenderserum vorhandenen HLA-Antikörper als häufige Ursache febriler Transfusionsreaktionen unwahrscheinlich, zumal ein solches antikörperhaltige Serum einem Empfänger transfundiert werden muß, der das korrespondierende Antigen besitzt, was bei dem extremen Polymorphismus äußerst unwahrscheinlich ist. Andererseits waren in neun Seren Antikörper gegen HLA-A2, dem häufigsten HLA-Antigen von Kaukasiern, zu finden. Diese Beobachtung und die Tatsache, daß ein Teil der Seren mehr als eine starke HLA-Spezifität enthält, erhöht das Risiko andererseits wieder. Unbekannt ist auch, wie spezifisch und wie reaktionsstark ein Antikörper sein muß, um beim Zusammentreffen mit dem korrespondierenden Antigen zu einer Transfusionsreaktion zu führen. In dem von AHRONS und KISSMEYER-NIELSEN beschriebenen Fall hatte es sich um einen spezifischen, reaktionsstarken (Titer des zytotoxischen Antikörpers 1:4) Antikörper gehandelt.

Von den zytotoxischen Seren dieser Untersuchung zeigten etwa die Hälfte mehr als 50% starker Reaktionen, die allerdings nicht immer spezifisch gegen ein Antigen gerichtet waren.
AHRONS und KISSMEYER-NIELSEN weisen darauf hin, daß die febrilen Transfusionsreaktionen ihrer Studie, deren Ursachen ungeklärt geblieben waren, und die evtl. auf HLA-Antikörper im Spenderserum zurückgeführt werden konnten, im allgemeinen nicht lebensbedrohlich waren. Dennoch können sie für einen kranken Patienten eine schwere Belastung darstellen und sollten deshalb vermieden werden.
Aus diesem Grunde ist man im Institut für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin dazu übergegangen, alle in dieser Untersuchung festgestellten Blutspenderinnen mit zytotoxischen Antikörpern von der Vollblutspende auszuschließen, bis keine Antikörper mehr in ihren Seren nachweisbar sind. Bis dahin wird ihr Blut zur Gewinnung von Erythrozytenkonzentraten herangezogen. Ebenso wird mit den Bluten der Neuspenderinnen verfahren, die regelmäßig vor der ersten Spende auch auf HLA-Antikörper untersucht werden.
Eine weitere Bedeutung der HLA-Antikörper ergibt sich aus einer Untersuchung von REEKERS et al. (79). Sie fanden bei Seren von vier Patienten, die eine Transfusion benötigten, einen positiven indirekten Coombs-Test mit einer größeren Zahl von Spendern, obwohl keine irregulären Erythrozytenantikörper nachweisbar waren. Weitere Untersuchungen mit diesen Seren zeigten dann, daß der indirekte Coombs-Test fast ausschließlich bei HLA-B7 tragenden Spendern positiv wurde. Bei Spendern ohne HLA-B7 blieb der Test negativ.
Diese Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß HLA-Antikörper das Ergebnis der Kreuzprobe durch Reaktion mit

HLA-Antigenen auf den Erythrozyten beeinflussen können. Danach wäre ein Einfluß der HLA-Antikörper auf die Kreuzprobe besonders bei Schwangeren zu erwarten, deren Seren nach den hier vorliegenden Untersuchungen in 13,1% der Fälle HLA-Antikörper enthalten. Ebenso wären im Minortest der Kreuzprobe bei weiblichen Blutspendern, wenn auch in geringerer Häufigkeit, ähnliche Einflüsse denkbar.

In welchem Umfang positive Kreuzproben auf HLA-Antikörper zurückgeführt werden können, läßt sich wohl nur durch jeweils anschließende Untersuchungen des Spender - und Empfängerblutes angeben. Es ist jedoch anzunehmen, daß nicht in jedem Fall die Kreuzprobe positiv wird, wenn Spendererythrozyten auf entsprechende HLA -Antikörper im Empfängerserum treffen und umgekehrt. NORDHAGEN (69,71) sowie NORDHAGEN und AAS (70) konnten in mehreren Untersuchungen zeigen, daß die Reaktivität der HLA-Antigene auf den Erythrozyten sehr variabel ist und offensichtlich von mehreren Faktoren abhängt. So fanden sich große Schwankungen der Reaktivität in Abhängigkeit von der Zeit der Blutentnahme und vom HLA -Typ des Probanden. Daneben ergeben sich individuelle Unterschiede, die nach Familienuntersuchungen (71) offensichtlich keinen festen Erbgang haben.

Nach diesen Untersuchungen ist zur Zeit nicht sicher vorhersehbar, ob bei negativer Kreuzprobe auch in vivo Reaktionen durch HLA-Antikörper gegen Spendererythrozyten ausbleiben.

NORDHAGEN und AAS (70) vermuteten, daß diese Reaktionen einen Einfluß auf die Überlebenszeit der transfundierten Erythrozyten haben müßten. Mit ihrer Untersuchung konnten sie zeigen, daß nur bei einem kleinen Teil der Erythrozyten die Überlebensdauer reduziert war, während der weitaus größte Teil eine normale Überlebenszeit aufwies. Ob innerhalb der transfundierten Erythrozytenfraktion Unterschiede in der Reaktivität vorliegen, oder ob die HLA-Antikörper des Empfängers sofort von einem Teil der Erythrozyten "gebunden" werden, ist noch ungeklärt.

Dem negativen Einfluß der HLA-Antikörper in der Transfusionsmedizin steht ihre große Bedeutung für die Typisierung von HLA-Antigenen entgegen. Während die Antikörpersuche mit geeigneten Methoden keine großen Schwierigkeiten bereitet, bringt die Identifizierung der Spezifität und die Charakterisierung der zytotoxischen Seren Probleme mit sich.

So sind auch für den endgültigen Einsatz der in dieser Arbeit gefundenen zytotoxischen Seren noch weitere Untersuchungen erforderlich, die über die bisherigen, mit serologischen und statistischen Methoden durchgeführten, hinausgehen.

Diese Notwendigkeit leitet sich, wie bereits erwähnt, aus der besonderen Problematik bei der Identifizierung des bzw. der im Serum enthaltenen Antikörper sowie der vollständigen Charakterisierung eines HLA-Antiserums ab.

So wirkt sich beispielsweise das Phänomen des Kopplungsungleichgewichts zwischen den Loci HLA-A,B und C erschwerend auf die Identifizierung der Antikörperspezifität aus, wie sich am Schwangerenserum Nr.184 zeigen läßt.

Dieses Serum reagierte signifikant häufig und stark mit HLA-Bw35 positiven Zellen, zeigte aber einen hohen Prozentsatz an Ausfällen. Bei der weiteren Untersuchung des Serums, vor allem mit neuen Testseren gegen Antigene des Locus C, zeigte sich, daß es neben den Reaktionen mit HLA-Bw35, Cw4 tragenden Zellen signifikant häufig und stark mit Zellen reagierte, die nur positiv für HLA-Cw4 waren. Reaktionen mit nur HLA-Bw35 positiven Zellen kamen nicht vor, ebenso erfolgten keine Ausfälle auf HLA-Cw4.

Es handelte sich also nicht, wie zuerst vermutet, um ein weniger gutes Anti-HLA-Bw35, sondern um ein sehr gutes Anti-HLA-Cw4. Das ausgeprägte Kopplungsungleichgewicht zwischen den Antigenen HLA-Bw35 und HLA-Cw4 (45) hatte zu der Fehlinterpretation geführt.

Noch schwieriger wird die Identifizierung von Antikörpern gegen bisher unbekannte HLA-Antigene, wenn diese Antigene mit bereits typisierbaren HLA-Antigenen übererwartungsmäßig häufig gekoppelt sind. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, alle Seren, deren Reaktionen zwar signifikant häufig und stark mit einem bestimmten Antigen erfolgen, die aber Ausfälle und reaktionsstarke Extras zeigen und daher in dieser Untersuchung unter Umständen der Qualitätsklasse III zugeordnet wurden, als Forschungsseren fortlaufend weiterzutesten.

Ausfälle eines reaktionsstarken Serums können aber auch auf einen Splitantikörper zurückzuführen sein. In diesem Fall reagiert das Serum reproduzierbar nicht mit bestimmten Zellen, die das "public"-Antigen tragen. Erst durch den Einsatz Split-erkennender Typisierungsseren, d.h. einer exakteren Typisierungsmöglichkeit der Testzellen, kann der Antikörper identifiziert werden. Da aber vor allem für die erst in jüngster Zeit als heterogen erkannten HLA-Antigene häufig spezifische Antiseren nicht in ausreichender Zahl zur Verfügung stehen, ist die Identifizierung solcher Antikörper zur Zeit oft nicht möglich. Dennoch werden reaktionsstarke Seren dieser Untersuchung, die nur wenige und schwache Extrareaktionen, dafür aber vermehrt Ausfälle zeigen, weiter auf Splitantikörper untersucht.

Allerdings muß einschränkend gesagt werden, daß die Unterscheidung zwischen serologischen Fehlern und reproduzierbaren Abweichungen der Reaktivität bestimmter Seren schwierig ist.
Serologische Fehlreaktionen sind möglicherweise auch als Ursache für die Zuordnung eines Serums, das keinen HLA-Antikörper enthält, zur Qualitätsklasse IV anzuschuldigen. Solche Fehlreaktionen lassen sich durch Kontamination der Lymphozytensuspension mit Granulozyten, überalterten Testzellen und Abänderung der Testvorschrift erklären.
Daneben können solche keinem bekannten HLA-Antigen zuzuordnenden Reaktionen sog. non-HLA Reaktionen sein, die z.B. durch Antikörper gegen granulozytenspezifische Merkmale hervorgerufen werden können. Außerdem gibt es, wie eine 1980 von CLASS et al. (20) veröffentlichte Arbeit zeigt, spezifische Antikörper gegen Monozytenantigene und Nierenendothelien, die nachweislich nicht den Anti-HLA-A,B,C-Antikörpern entsprechen. Kontamination der Lymphozytensuspension mit Monozyten können daher möglicherweise ebenfalls Ursache von non-HLA Reaktionen sein.
Während von den Seren der Klassen III und IV nur einige als Forschungsseren weiter untersucht werden, werden alle Seren der Klassen I und II nochmals auf den Mikrotestplatten ausgetestet. Zur vollständigen Charakterisierung, und um sie als Typisierungsseren zuzulassen, müssen noch Absorptionsstudien durchgeführt werden. Dabei sollen die gefundenen Antikörper bestätigt und kreuzreagierende Antikörper in sublytischen Konzentrationen nachgewiesen werden. Absorbiert werden auch die Seren der zweiten Klasse. Zwar erfüllen sie die an ein HLA-Testserum gestellten Qualitätsanfor-

derungen nicht, liefern aber dennoch reproduzierbar gute Ergebnisse.
Aus der Erkenntnis heraus, daß es keine zwei Seren gleicher Spezifität gibt, die identisch reagieren, ist man in der HLA-Serologie dazu übergegangen, für die Definition eines Antigens mehrere Antiseren zu verwenden. Die Seren der zweiten Klasse sollen die Zahl der zur Verfügung stehenden Seren einer Spezifität erhöhen und bis zur Gewinnung qualitativ besserer Seren, als laborinterne Testseren, eine zusätzliche Hilfe bieten.
Neben den Antikörpern gegen die Antigene der Loci HLA-A,B und C können die Schwangeren-und Blutspenderinnenseren auch noch B-zellspezifische Antikörper enthalten, deren Nachweis mit einem modifizierten Mikrolymphozytotoxizitätstest erfolgt. Als Testzellen dienen B-zellangereicherte Lymphozytensuspensionen. Untersuchungen aus jüngster Zeit (11,28) haben ergeben, daß Seren, die nur B-zellspezifische Antikörper enthalten, selten sind, dagegen Seren mit starken HLA-A,B, oder C Spezifitäten in der Regel auch starke Ia-Antikörper aufweisen. Daher eignen sich neben den reaktionsstarken Seren der Klasse III und IV besonders die Seren der Klasse I und II zur Untersuchung auf MLC-blockierende Antikörper. Vor Durchführung des Tests müssen die HLA-A,B,C-Antikörper durch Absorption mit Thrombozyten entfernt werden.
Insgesamt wurden, trotz der relativ kleinen Zahl untersuchter Schwangerenseren, einige gefunden, die als HLA-Test-bzw. Forschungsseren geeignet zu sein scheinen.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Anschluß an die Beschreibung der Entdeckung und der Genetik des HLA-Systems wurde die gegenwärtige klinische Bedeutung dieses Systems kurz dargestellt.

Auf die Möglichkeiten der Gewinnung von HLA-Antiseren wurde im Folgenden eingegangen, wobei es in erster Linie darum ging, die Effektivität der einzelnen Methoden sowie ihre Vor- und Nachteile aufzuzeigen. Die Probleme der HLA-Serologie, vor allem im Hinblick auf die Bildung kreuzreagierender Antikörper, deren molekularen Grundlage und praktische Bedeutung wurden angeschnitten.
Anschließend wurden einige Methoden zur Bestimmung der Spezifität von zytotoxischen HLA-Antiseren vorgestellt und das in dieser Untersuchung angewandte Verfahren zur Charakterisierung der Antiseren beschrieben.
Der Anstoß zu der vorliegenden Arbeit erfolgte durch Untersuchungen von PAYNE und ROLFS (75), AHRONS und KISSMEYER-NIELSEN (3,4) sowie REEKERS et al. (79), die auf die Bedeutung der HLA-Antikörper in der Transfusionsmedizin hingewiesen hatten.
PAYNE und ROLFS (75) zeigten, daß Frauen wesentlich häufiger von febrilen Transfusionsreaktionen betroffen sind als Männer, da sie durch die natürliche Sensibilisierung gegen HLA-Antigene während einer Schwangerschaft schon HLA-Antikörper bilden und damit bereits bei der ersten Bluttransfusion febrile Reaktionen zeigen können. Wie hoch die Sensibilisierungsrate während einer bzw. mehrerer Schwangerschaften ist, sollte durch die Untersuchung von 305 Seren primi-und multiparer Schwangeren festgestellt werden.

Bei den Primiparae lag die Sensibilisierungsrate mit 9% um 7,4% niedriger als bei den Multiparae mit 16,4%. Insgesamt fanden sich 13,1% zytotoxische HLA -Antiseren. Dieses Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen anderer Autoren (91,109) überein.
Daß den Frauen nicht nur als Empfänger von Bluttransfusionen, sondern auch als Blutspender besondere Beachtung geschenkt werden muß, zeigten Studien von AHRONS und KISSMEYER-NIELSEN (3,4). Sie beschrieben einen Fall, in dem HLA-Antikörper im Spenderserum die Ursache einer febrilen Transfusionsreaktion gewesen waren. Um einen Aufschluß über die Häufigkeit von zytotoxischen HLA-Antikörpern bei den weiblichen Blutspendern des Instituts für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin zu bekommen, wurden insgesamt 1150 Seren dieser Frauen untersucht. Eine Untersuchung der männlichen Blutspender erübrigte sich, da sie keiner natürlichen Sensibilisierung unterliegen und die Antikörperbildung durch vorausgegangene Transfusionen oder Transplantationen als minimal anzusehen ist.
Von den 1150 Seren der Blutspenderinnen zeigten 55(4,8%) zytotoxische Reaktionen im Lymphozytotoxizitätstest. Obwohl die Wahrscheinlichkeit schwerer febriler Transfusionsreaktionen durch HLA-Antikörper gering ist, ist man dennoch im Institut für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin dazu übergegangen, das Blut von Blutspenderinnen mit HLA-Antikörpern nicht zur Vollbluttransfusion zu verwenden, sondern zur Erythrozytenkonzentratgewinnung heranzuziehen.
Der in der Literatur erwähnte Einfluß der HLA-Antikörper auf die Kreuzprobe (79) wurde diskutiert, ebenso wie die Untersuchungen der Reaktivität der HLA-Antigene auf den Erythrozyten durch NORDHAGEN und AAS (69, 70,71).
Abschließend wurde die Problematik der Identifizierung und Charakterisierung von HLA-Antiseren an Hand von Beispielen der eigenen Untersuchung erläutert.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ahrons, S. :
   HL-A antibodies : Influence on the human foetus
   Tissue Antigens 1, 129-136 (1971)

2. Ahrons, S., S. Glavind-Kristensen :
   Cytotoxic HL-A antibodies : Immunglobulin classification
   Tissue Antigens 1, 121-128 (1971)

3. Ahrons, S., F. Kissmeyer-Nielsen :
   Serological investigations of 1358 transfusion reactions in 74000 transfusions
   Dan. Med. Bull. 15, 259-262 (1968)

4. Ahrons, S., F. Kissmeyer-Nielsen :
   Febrile transfusion reaction caused by minor specific (LA 1) leucocyte incompatibility
   Dan. Med. Bull. 15, 257-258 (1968)

5. Albert, E.D., M.R. Mickey, P.I. Terasaki :
   A new approach to cross-reactivity in the HL-A system
   Symp. Ser. Immunol. Standard 18, 156-164 (1973)
   Karger, Basel

6. Allen, F.H. :
   Linkage of HLA and GBG
   Vox Sang. 27, 382-384 (1974)

7. Amiel, J.L. :
   Study of the leucocyte phenotypes in Hodgkin ś disease
   Histocompatibility Testing, 79-81 (1967)
   Munksgaard, Copenhagen
   E.S. Curtoni, P.L. Mattiuz, M.R. Tosi, eds.

8. Amiel, J.L. :
   Hodgkin's disease and HL-A
   Transplant. Proc. 3, 1277 (1971)

9. Armitage, P. :
   Statistical methods in medical research
   Blackwell, Oxford (1971)

10. Bach, F., N.K. Voynow :
    One way stimulation in mixed leucocyte cultures
    Science 153, 545-547 (1966)

11. Baricordi, O.R., M. Belvedere, U. Fagiolo, T.M. Neri, S. Trabace :
    Screening for sera with B cell antibodies in region Italy I
    Tissue Antigens 10, 130 (1977)

12. Bertrams, J., E. Kuwert, K. Noll :
Leukozyten-Isoantikörper : III. Identifizierung und Charakterisierung monospezifischer HL-A-Antiseren zur Histokompatibilitätstestung
Z. med. Mikrobiol. u. Immunol. 156, 149-153 (1971)

13. Bodmer, W.F. :
Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 6
in : Human gene mapping 3
Hrsg. Daniel Bergsma
Birth defects : ORS XII. 7, 24-30 (1976)
Karger, Basel-New York

14. Bodmer, W., J. Bodmer, D. Ihde, S. Adler :
Genetic and serological assosiation analysis of the HL-A leucocyte system. Computer applications in genetics
ed. N.E. Morten, 117-127 (1969)

15. Boyum, A. :
Separation of leucocytes from blood and bone marrow
Scand. J. clin. Lab. Invest. 97, 21 (1968)

16. Brewerton, D.A., M. Caffrey, F.D. Hart, D.C.O. James, A. Nicholls, R.D. Sturrock :
Ankylosing spondylitis and HL-A 27
Lancet i, 904-907 (1973)

17. Brittingham, T.E., H. Chaplin (Jr.) :
Febrile transfusion reactions caused by sensitivity to donor leukocytes and platelets
J. Amer. med. Ass. 165, 819-825 (1957)

18. Cannady, W.G., P.R. Reckel, D. Tripodi, S.M. Show, D. Baldassari, L.A. Metz :
Sensitivity of various HLA typing techniques
Tissue Antigens 4, 564-570 (1974)

19. Ceppellini, R., E.S. Curtoni, P.L. Mattiuz, V. Miggiano, G. Scudeller, A. Serra :
Genetics of leukocyte antigens. A family study of segregation and linkage
Histocompatibility Testing, 149-187 (1967)
Munksgaard, Copenhagen

20. Claas, F.H.J., L.C. Paul, L.A. van Es, J.J. van Rood :
Antibodies against donor antigens on endothelial cells and monocytes in eluates of rejected kidney allografts
Tissue Antigens 15, 19-24 (1980)

21. Colombani, J., M. Colombani, L. Degos, E. Terrier, Y. Gaudy, H. Dastot :
Effect of cross reactions on HL-A antigen immunogenicity
Tissue Antigens 4, 136-145 (1974)

22. Cross, D.E., F.C. Whittier, R.F. Greiner, J. Foxworth, P. Weaver, J.A. Ross :
Preparation of monospecific HLA antibodies from cross-reactive multispecific antisera
Tissue Antigens 8, 101-108 (1976)

23. Dausset, J., A. Nenna :
Presence d'une leuko-agglutinine dans le serum d'une case d'agranulocytose chronique
C. R. Soc. Biol, (Paris) 146, 1539 (1952)

24. Dausset, J. :
Leuco-agglutinins. IV. Leuco-agglutinins and blood transfusion
Vox Sang. (Basel) 4, 190-198 (1954)

25. Dausset, J. :
Iso-leuco-anticorps
Acta haemat. (Basel) 20, 156-166 (1958)

26. Dausset, J., P. Ivanyi, D. Ivanyi :
Tissue alloantigens in humans. Identification of a complex system
Histocompatibility Testing, 51-62 (1965)
Munksgaard, Copenhagen

27. Dausset, J., J. Hors, M. Busson, H. Festenstein, R.T.D. Oliver, A.M.I. Paris, J.A. Sachs :
Serologically defined HL-A antigens and long-term survival of cadaver kidney transplants
New Engl. J. Med. 290, 979-983 (1974)

28. Décary, F., L. van Helden-Henningheim, D. van Griethuysen, F.M. Helmerhorst, A.J.M. van der Werf, C.P. Engelfriet :
Detection of B-cell-specific alloantibodies in pregnancy sera in the lymphocytotoxicity and the indirect immunofluorescence techniques
Tissue Antigens 14, 1-9 (1979)

29. Doughty, R.W., K. Gelsthorpe :
A scheme for screening blood samples to aquire lymphocyte cytotoxic antisera for tissue typing and results of an initial screening programme
Transplantation 12, 429-433 (1971)

30. Doughty, R.W., K.Gelsthorpe :
Some parameters of lymphocyte antibody activity through pregnancy and further eluates of placental material
Tissue Antigens 8, 43-48 (1976)

31. Doughty, R.W., K. Gelsthorpe :
An initial investigation of lymphocyte antibody activity through pregnancy and in eluates prepared from placental material
Tissue Antigens 4, 291-298 (1974)

32. Dupont, B., C. Jersild, G.S. Hansen, L. Staub Nielsen, M. Thomsen, A. Svejgaard :
Typing for MLC determinants by means of LD-homozygous and LD-heterozygous test cells
Transpl. Proc. 5, 1543-1549 (1973)

33. Einstein, A.B.(Jr.), D.L. Mann, H.G. Gordon, R.-J. Trapani, J.L. Fahey :
Heterologous antisera against specific HL-A antigens
Transplantation 12, 299-303 (1971)

34. Falchuk, J.M., G.H. Rogentine, W. Strober :
Predominance of histocompatibility antigen HL-A 8 in patients with gluten-sensitive enteropathy
J. Clin. Invest. 51, 1602 (1972)

35. Falk, J., T. Csoba :
HL-A antigens and survival in Hodgkin's disease
Lancet ii, 1118 (1971)

36. Ferrara, G.B., R.M. Tosi, G. Azzolina, G. Carminati, F. Kissmeyer-Nielsen :
The production of anti HL-A cytotoxic antisera through planned immunization by intravenous injection of small aliquots of whole blood.
I. Immunization of unrelated recipients
Tissue Antigens 2, 359-373 (1972)

37. Forbes, J.K., P.J. Morris :
Analysis of HL-A antigens in patients with Hodgkin's disease and their families
J. Clin. Invest. 51, 1156 (1972)

38. Fu, S.M., H.G. Kunkel, H.P. Brusman, F.H. Allen, M. Fohino :
Evidence for linkage between HL-A histocompatibility genes and those involved in the synthesis of the second component of complement
J. exp. Med.140, 1108-1111 (1974)

39. Gedde-Dahl, T.(Jr.), C.M. Giles, E. Thorsby, B. Olaisen, E.B. Robson :
Chido blood group and the HLA region
in : Human gene mapping 3
Hrsg. Daniel Bergsma
Birth defects : OAS XII. 7, 307-310 (1976)
Karger, Basel-New York

40. Gedde-Dahl, T.(Jr.), E.B. Robson :
Rodgers blood group and the HLA region
in : Human gene mapping 3
Hrsg. Daniel Bergsma
Birth defects : OAS XII. 7, 311-312 (1976)
Karger, Basel-New York

41. Gorer, P.A. :
Antigenetic basis of tumor transplantation
J. Path. Bact. 47, 231 (1938)

42. Götze, D. (Hrsg.) :
The major histocompatibility system in man and animals
Berlin, Springer-Verlag (1977)
42a. Götze, D., 1
42b. Albert, F., Götze, D., 27-30
42c. Albert, F., Götze, D., 18-20

43. Graw, R.G.(Jr.), I.M. Goldstein, H.J. Eyre, P.I. Terasaki:
Histocompatibility testing for leucocyte transfusion
Lancet ii, 77-83 (1970)

44. Harris, J.P., J. Tegoli, J. Swanson, N. Fisher, J. Gavin, J. Noades :
A nebulous antibody responsible for crossmatching difficulties (Chido)
Vox Sang. (Basel) 12, 140-142 (1967)

45. Hiller, C., M. Bischoff, A. Schmidt, K. Bender :
Analysis of the HLA-ABC linkage disequilibrium: decreasing strength of gametic association with increasing map distance
Hum. Genet. 41, 301-312 (1978)

46. Hirschhorn, K., F. Bach, R.L. Kolodny, I.L. Firschen :
Immune response and mitosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro
Science 142, 1185 (1963)

47. Hooff, J.P.van, H.M.A. Schippers, G.J. van der Steen, J.J.van Rood :
Efficacy of HL-A matching in Eurotransplant
Lancet ii, 1385-1388 (1972)

48. Ivanyi, P., J. Dausset :
Allo-antigens and antigenic factors of human leukocytes. An hypothesis
Vox Sang. (Basel) 11, 3 (1966)

49. Jensen, K.G. :
Leucocyte antibodies in serums of pregnant women. Serology and clinic
Vox Sang. (Basel) 9, 315-332 (1964)

50. Johannsen, R., F.R. Seiler :
Production of cytotoxic HL-A heteroantibodies in chimpanzees
Symp. Ser. Immunol. Standard 18, 69-79 (1973)
Karger, Basel-New York

51. Jung, H.O., L.D. Maclean :
Comparative immunogenicity of HL-A antigens : A studie in primiparas
Tissue Antigens 5, 33-37 (1975)

52. Kissmeyer-Nielsen, F., A. Svejgaard, S. Ahrons, L. Staub-Nielsen :
Crossing-over within the HL-A system
Nature (Lond.) 224, 75-76 (1969)

53. Kissmeyer-Nielsen, F., N. Ehlers, T. Kristensen, L.U. Lamm :
The HLA system, serologie and transplantation in : HLA system - New aspects
Hrsg : G.B. Ferrara
Elsevier, North-Holland Biomedical Press, 69-91 (1977)

54. Kissmeyer-Nielsen, F., K.B. Jensen, G.B. Ferrara, K.E. Kjerbye, A. Svejgaard :
HL-A phenotypes in Hodgkin's disease
Preliminary report
Transplant. Proc. 3, 1287 (1971)

55. Kissmeyer-Nielsen, F., K.E. Kjerbye :
HL-A antisera and their identification
Tissue Antigens 2, 182-188 (1972)

56. Kourilsky, F.M., D. Silvestre, C. Neanport-Santes, Y. Loosfelt, J. Dausset :
Antibody-induced redistribution of HL-A antigens at the cell surface
Eur. J. Immunol. 2, 249-257 (1972)

57. Leeuwen, A.van, H.R.E. Schuit, J.J. van Rood :
Typing for MLC (LD) : II. The selection of nonstimulator cells by MLC inhibition fluorescence antibody studies
Transplant. Proc. 5, 1539-1542 (1973)

58. Legrand, L., J. Dausset, F.T. Rapaport :
Serological and genetic studies on the HL-A system
Results of host immunization within haplo-identical donor-recipient combinations
Transfusion 11, 233-250 (1971)

59. Legrand, L., J.Dausset :
Serological evidence of the existence of several antigenic determinants (or factors) on the HL-A gene products
Histocompatibility Testing, 441-453 (1972)
J. Dausset and J. Colombani, eds.
Munksgaard, Copenhagen

60. Longster, G., C.M. Giles :
A new antibody specificity, anti-Rg^a, reacting with a red cell and serum antigen
Vox Sang. (Basel) 29, 213-214 (1975)

61. Mayr, W.R. :
Grundlagen zur Berechnung der Vaterschaftswahrscheinlichkeit im HL-A System
Z. Immun.-Forsch. 144, 18-27 (1972)

62. Medawar, P.B. :
Immunity to homologous grafted skin. II. The relationship between the antigens of blood and skin
Brit. J. Exp. Path. 27, 15 (1946)

63. Mempel, W., E. Albert, A. Burger :
Further evidence for a separate MLC-locus
Tissue Antigens 2, 250-254 (1972)

64. Mempel, W., H. Grosse-Wilde, P. Baumann, B. Netzel, I. Steinbauer-Rosenthal, S. Scholz, J. Bertrams, E.D. Albert :
Population genetics of the MLC response : Typing for MLC determinants using homozygous and heterozygous reference cells
Transplant. Proc. 5, 1529-1538 (1973)

65. Mittal, K.K., P.I. Terasaki :
Serological cross-reactivity in the HL-A system
Tissue Antigens 4, 146-156 (1974)

66. Mittal, K.K. :
Standardization of the HLA typing method and reagents
Vox Sang. (Basel) 34, 58-63 (1978)

67. Mueller-Eckhardt, Ch., D. Heinrich, V. Rothenberg :
Studies on cross reactive HL-A antibodies by elution with platelets
Tissue Antigens 2, 436-446 (1972)

68. Nomenclature for factors of the HLA system - 1977
Tissue Antigens 11, 81-86 (1978)

69. Nordhagen, R. :
Association between HLA and red cell antigens
VI. Family studies
Vox Sang. (Basel) 35, 58-64 (1978)

70. Nordhagen, R.,M. Aas :
Association between HLA and red cell antigens
VII. Survival studies of incompatible red blood cells in a patient with HLA-associated haemagglutinins
Vox Sang. (Basel) 35, 319-323 (1978)

71. Nordhagen, R. :
HLA antigens on red blood cells
Vox Sang. (Basel) 37, 209-215 (1979)

72. Opelz, G., M.R. Mickey, P.I. Terasaki :
Identification of unresponsive kidney transplant recipients
Lancet i, 868-871 (1972)

73. Payne, R., M.R. Rolfs :
Fetomaternal leucocyte incompatibility
J. Clin. Invest. 37, 1756-1763 (1958)

74. Payne, R., M. Tripp, J. Weigle, W. Bodmer, J. Bodmer :
A new leucocyte iso-antigen system in man
Cold. Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 29, 285-295 (1964)

75. Payne, R., M.R. Rolfs :
Further observations on leukoagglutinin transfusion reactions
Am. J. Med. 29, 449-458 (1960)

76. Payne, R. :
Neonatal neutropenia and leucoagglutinines
Pediatrics 33, 194-204 (1964)

77. Ramm, B., G. Hofmann :
Biomathematik und medizinische Statistik
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart (1976)

78. Rappeport, J., M. Mihm, E. Reinherz, S. Lopansri, R. Parkman :
Acute graft-versus-host disease in recipients of bone-marrow transplants from identical twin donors
Lancet ii,717-720 (1979)

79. Reekers, P., R.L. McShine, J.H. Bloo, V.A.J. Kunst :
Positive indirect antiglobulin tests caused by leucocyte antibodies
Ztschr. für Immunitätsforschung 148, 402-403 (1975)

80. Rodey, G.E., B. Sturm, R.H. Aster :
Cross-reactive HL-A antibodies. Separation of multiple HL-A antibody specificities by platelet adsorption and acid elution
Tissue Antigens 3, 63-69 (1973)

81. Rood, J.J.van, J.G. Eernisse, A. van Leeuwen :
Leucocyte antibodies in sera from pregnant women
Nature (Lond.) 181, 1735-1763 (1958)

82. Rood, J.J.van :
Leucocyte grouping
Thesis, Leiden (1962)

83. Rood, J.J.van, A.van Leeuwen, H.M.A. Schippers, R. Ceppellini, P.L. Mattiuz, S. Curtoni :
Leucocyte groups and their relation to homotransplantation
Ann. N. Y. Acad. Sci. 129, 467 (1966)

84. Rood, J.J.van, A.van Leeuwen, G.G. Perijn, Q. Laudsbergen, E. Goulmy, A. Termijtelen, B.A. Bradley :
HLA compatibility in clinical transplantation
Transplant. Proc. 9, 459-467 (1977)

85. Rood, J.J.van, A.van Leeuwen, J.J. Keuning, A. Blusse van oud Alblas :
The serological recognition of the human MLC determinants using a modified cytotoxic technique
Tissue Antigens 5, 73-79 (1975)

86. Sachs, D.H., J.L. Cone :
A mouse B-cell alloantigen determined by gene(s) linked to the major histocompatibility complex
J. exp. Med. 138, 1289-1304 (1973)

87. Sandberg, L., E. Thorsby, F. Kissmeyer-Nielsen, A. Lindholm :
Evidence of a third sublocus within the HL-A chromosomal region
Histocompatibility Testing, 165-169 (1970)
Munksgaard, Copenhagen

88. Schlosstein, L., P.I. Terasaki, R. Bluestone, C.M. Pearson :
High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis
New Engl. J. Med. 288, 704-706 (1973)

89. Selwood, N.H. :
Data analysis for leucocyte groups in man
Transplantation 7, 315-331 (1969)

90. Sheehy, M.J. :
Reconsideration of genetic mapping of the weak LD locus
Tissue Antigens 11, 186-189 (1978)

91. Stastny, P.:
Tissue typing antisera from immunization by pregnancy
Tissue Antigens 2, 123-127 (1972)

92. Staub-Nielsen, L., A. Svejgaard :
HL-A immunization and HL-A types in pregnancy
Tissue Antigens 2, 316-327 (1972)

93. Stokes, P.L., P. Asquith, G.K.T. Holmes, P. Mackintosh, W.T. Cooke :
Histocompatibility antigens associated with adult coeliac disease
Lancet ii, 162 (1972)

94. Strominger, J.L., D.L. Mann, P. Parham, R. Robb, T. Springer, C. Terhorst :
Structure of HLA-A and B antigens isolated from cultured human lymphocytes
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41, 323-329 (1977)

95. Svejgaard, A., L. Staub-Nielsen, L.P. Ryder, F. Kissmeyer-Nielsen, L. Sandberg, A. Lindholm, E. Thorsby :
Subdivision of HL-A antigens. Evidence of a "new" segregant series
Histocompatibility Testing, 465-473 (1972)
Munksgaard, Copenhagen

96. Svejgaard, A., F. Kissmeyer-Nielsen :
Cross-reactive human HL-A isoantibodies
Nature (Lond.) 219, 868-869 (1968)

97. Svejgaard, A. :
Synergistic action of HL-A isoantibodies
Nature (Lond.) 222, 94-95 (1969)

98. Svejgaard, A. :
The HLA system : an introductory survey
Karger, Basel-New York (1975)

99. Svejgaard, A., L.P. Ryder :
Associations between HLA and disease
in : HLA and disease
Dausset, J., A. Svejgaard (eds.),46-71 (1977)
Munksgaard, Copenhagen

100. Teisberg, P., J. Akesson, B. Olaisen, T. Gedde-Dahl, E. Thorsby :
Genetic polymorphism of C4 in man and localisation of a structural C4 locus to the HLA gene complex of chromosome 6
Nature (Lond.) 264, 253-254 (1976)

101. Terasaki, P.I., M.R. Mickey, J.N. Yamazaki, D. Vredevoe :
Maternal-fetal incompatibility. I. Incidence of HL-A antibodies and possible associations with congenital anormalities
Transplantation 9, 538-543 (1970)

102. Terasaki, P.I., J.D. Mc Clelland :
Microdroplet assay of human serum cytotoxins
Nature (Lond.) 204, 998-1000 (1964)

103. Thomas, E.D., R. Storb, R.A. Clift, A. Fefer, L. Johnson, P. Nieman, K.G. Lerner, H. Glucksberg, D. Buckner :
Bone marrow transplantation
New Engl. J. Med. 292, 832-843 (1975)

104. Tongio, M.M., A. Berrebi, S. Mayer :
A study of lymphocytotoxic antibodies in multiparous women having had at least four pregnancies
Tissue Antigens 2, 538-543 (1972)

105. Tongio, M.M., A. Berrebi, S. Mayer :
Anti-HL-A foeto-maternal immunization. Persistence of antibodies
Tissue Antigens 3, 115-122 (1973)

106. Tongio, M.M., A. Berrebi, B. Pfeiffer, S. Mayer :
Serological studies on lymphocytotoxic antibodies in primiparous women
Tissue Antigens 1, 243-257 (1971)

107. Tongio, M.M., S. Mayer :
Transfer of HL-A antibodies from the mother to the child
Transplantation 20, 163-166 (1975)

108. Tovey, G.H., S.D. Nelson, B. Moore :
Response in pregnancy to LA and FOUR series antigens
Symp. Ser. Immunol. Standard 18, 53-56 (1973)
Karger, Basel-New York

109. Vives, J., A. Gelabert, R. Castillo :
HLA antibodies and period of gestation : Decline in frequency of positive Sera during last trimester
Tissue Antigens 7, 209-212 (1976)

110. Walford, R.L., E. Shanhrom, G.M. Troup, E. Zeller, B. Ackermann :
Lymphocyte grouping with defined antisera
Histocompatibility Testing, 221 (1967)
Munksgaard, Copenhagen

111. White, S.H., V.D. Newcomer, M.R. Mickey, P.I. Terasaki :
Disturbance of HL-A antigen frequency in psoriasis
New Engl. J. Med. 287, 740 (1972)

112. Yankee, R.A., K.S. Graff, R. Dowling, E.S. Henderson :
Selection of unrelated compatible platelet donors by lymphocyte HLA-matching
New Engl. J. Med. 288, 760-764 (1973)

113. Yunis, E.J., D.B. Amos :
Three closely linked genetic systems relevant to transplantation
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 3031-3035 (1971)

114. Zinkernagel, R.M., P.C. Doherty :
Possible mechanisms of disease-susceptibility association with major transplantation antigens
in : HLA and disease, 256 (1977)
Dausset, J., A. Svejgaard (eds.)
Munksgaard, Copenhagen

9. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. H. Brüster besonders herzlich für die Überlassung des Themas und seine Unterstützung danken.

Bei Frau Dr. B. Kuntz bedanke ich mich für wichtige Anregungen und für ihre ständige, bereitwillige Hilfe.

Herrn Prof. Dr. L. Beck, Direktor der Frauenklinik der Universität Düsseldorf, danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Untersuchung der Schwangeren.

Frau E. Meschter danke ich herzlich für ihre technische Hilfe.

Lebenslauf

Am 21.10.1954 wurde ich als Tochter von Rudolf Götz und dessen Ehefrau Theresia, geb. Pichner, in Bor, Jugoslawien, geboren.

1957 übersiedelte meine Familie in die Bundesrepublik Deutschland und nahm die deutsche Staatsangehörigkeit an.

Von 1961 bis 1966 ging ich in die Städtische Volksschule Oberhausen. Nach der fünften Klasse wechselte ich zur Städtischen Karl-Broermann-Realschule und schloß 1971 mit der Mittleren Reife ab. Daran anschließend besuchte ich von 1971 bis 1974 das Städtische Gymnasium an der Lohstraße.

Nach der Reifeprüfung studierte ich im Wintersemester 1974/75 Chemie an der Ruhruniversität Bochum.

Im Sommersemester 1975 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Düsseldorf, wo ich 1977 die Ärztliche Vorprüfung und 1978 den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ablegte.

Nach dem Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im April 1980 begann ich die Ausbildung im Praktischen Jahr in den Städtischen Krankenanstalten Krefeld.